



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE POLYKAPROLAKTONOVÝCH  
NANOVLÁKENNÝCH MEMBRÁN**

BIOMEDICAL APPLICATIONS OF POLYCAPROLACTONE NANOFIBROUS MATS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Pavel Dvořák**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Mgr. Lenka Zajíčková, Ph.D.**

**BRNO 2021**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1493/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Bc. Pavel Dvořák**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Lenka Zajíčková, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Biomedicínské aplikace polykaprolaktonových nanovláknenných membrán

### Zadání diplomové práce:

Cílem práce je výzkum modifikace polykaprolaktonových nanovláknenných membrán zaměřený na aplikaci v antibakteriálních krytech ran a náhradních cévních tkáních. Nanovláknenné membrány budou modifikovány plazmovými metodami a pomocí antibakteriálních úprav.

### Termín odevzdání diplomové práce: 28.5.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Pavel Dvořák  
student(ka)

-----  
doc. Mgr. Lenka Zajíčková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá polykaprolaktonovými (PCL) nanovláknny a jejich modifikací. PCL vlákna byla podrobena depozici plazmovými aminovými polymery v nízkotlakém pulzním radiofrekvenčním kapacitně vázaném výboji za použití monomeru cyklopropylaminu (CPA). Na nadeponovaný povrch byl imobilizován kolagen jako protein extracelulární matrix (ECM) a byla sledována proliferace buněk na modifikovaném povrchu nanovláken. Neupravená PCL vlákna byla také podrobena depozici antibakteriální vrstvy mědi, a vlákna byla charakterizována pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS) a energeticky disperzní spektroskopie (EDX).

## **ABSTRACT**

The diploma thesis deals with the treatment of polycaprolactone (PCL) nanofibers. PCL fibers were subjected to the deposition of plasma amine polymers in a low pressure pulsed radiofrequency capacitively coupled discharge using cyclopropylamine monomer (CPA). Collagen as an extracellular matrix (ECM) protein was immobilized and cell proliferation on the modified nanofiber surface was monitored. Untreated PCL fibers were also subjected to the deposition of an antibacterial copper layer, and the fibers were characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and energy dispersive spectroscopy (EDX).

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

plazma, PECVD, ECM proteiny, kolagen, PCL nanovláknna, cyklopropylamin, elektrostatické zvlákňování, plazmová polymerizace, SEM, XPS, magnetronové naprašování, EDX

## **KEYWORDS**

plasma, PECVD, ECM proteins, collagen, PCL nanofibers, cyclopropylamine, electrospinning, plasma polymerization, SEM, XPS, magnetron sputtering, EDX

DVOŘÁK, Pavel. *Biomedicínské aplikace polykaprolaktonových nanovláknenných membrán*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/132039>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Lenka Zajíčková.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
Pavel Dvořák

Rád bych poděkoval vedoucí mé práce doc. Mgr. Lence Zajíčkové, Ph.D. za odborné vedení, přátelský přístup, trpělivost a poskytnutí možností kariérního růstu. Dále bych rád poděkoval Ing. Lucii Blahové, Ph.D. za vedení v oblasti experimentální části práce, její čas, který se mnou strávila, ale hlavně za pevné nervy a trpělivost, kterou se mnou měla. Nemohu zapomenout poděkovat ani Mgr. Jiřině Medalové, Ph.D. a Mgr. Petře Černochové, které mě vedly v oblasti práce s buňkami a naučily mě mít hodně trpělivosti s každými buňkami. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Davidu Nečasovi, Ph.D. za výpomoc při statistickém zpracování výsledků. Také bych chtěl poděkovat Bc. Anně Dolečkové a Bc. Janě Bartošíkové za občasnou výpomoc s buněčnými experimenty a v neposlední řadě Adéle Jurčíkové za jazykovou korekturu diplomové práce. Závěrem bych chtěl poděkovat CEITEC Nano za poskytnutí vybavení pro analýzu vzorků, protože část práce byla provedena za podpory výzkumné infrastruktury CzechNanoLab (ID LM2018110, MŠMT, 2020–2022), CEITEC Vysoké učení technické v Brně.

# Obsah

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Nanovláknenné membrány .....	9
2.1.1	Elektrostatické zvlákňování.....	9
2.1.2	Disperzní zákon pro sférickou kapku .....	11
2.1.3	Koaxiální elektrostatické zvlákňování.....	12
2.1.4	Technologie Nanospider™.....	13
2.2	Plazmové modifikace povrchu materiálů.....	16
2.2.1	Reakce v plazmatu.....	17
2.2.2	Kapacitně vázaný doutnavý výboj.....	23
2.2.3	Depozice magnetronovým naprašováním .....	24
2.2.4	Plazmochemická depozice z plynné fáze .....	25
2.2.5	Plazmové aminové polymery .....	27
2.3	Proteiny extracelulární matrix.....	28
2.3.1	Kolagen.....	28
2.3.2	Imobilizace kolagenu.....	29
2.4	Buňky studované v této práci.....	31
2.4.1	Buňky hladkého cévního svalstva .....	31
2.4.2	Keratinocyty .....	33
2.5	Principy použitých analytických metod.....	34
2.5.1	Rentgenová fotoelektronová spektroskopie.....	34
2.5.2	Skenovací elektronová mikroskopie.....	36
2.5.3	Fluorescenční mikroskop.....	37
2.5.4	Luminometr .....	38
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	40
3.1	Použité materiály .....	40
3.2	Elektrostatické zvlákňování nanovláken.....	40
3.3	Depozice antibakteriální vrstvy .....	41
3.4	Depozice aminových vrstev .....	41
3.5	Imobilizace kolagenu .....	42
3.6	Charakterizace připravených materiálů .....	42
3.7	Proliferace buněk na nanovláčkách .....	43

3.7.1	ATP test .....	44
3.7.2	Resazurinové barvení .....	44
3.7.3	Počítání buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu.....	44
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	45
4.1	Volba vhodného roztoku kolagenu pro jeho imobilizaci na povrchu .....	45
4.2	Vlastnosti modifikovaných substrátů.....	47
4.2.1	XPS analýza modifikovaných substrátů .....	47
4.2.2	SEM analýza PCL nanovláken .....	51
4.2.3	SEM analýza kultivačních misek .....	55
4.3	Kultivace VSMC na modifikovaných PCL nanovlákních .....	57
4.4	Proliferační testy na těsnost korunek CellCrown™ .....	59
4.5	Proliferační testy na kultivačních miskách .....	61
4.5.1	Proliferační testy VSMC na kultivačních miskách .....	61
4.5.2	HaCaT buňky.....	67
4.6	Úprava PCL vláken antibakteriální látkou.....	72
5	ZÁVĚR.....	79
6	ZDROJE.....	81
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	89

# 1 ÚVOD

Biodegradabilní elektrostaticky zvlákněná nanovlákná jsou v poslední době důležitým předmětem výzkumu v oblasti tkáňového inženýrství [1], v oblasti cíleného podávání léčiv [2] a také jsou využívány jako filtry v čističkách odpadních vod [3]. Výhodou syntetických nanovláken jsou jejich nízké výrobní náklady a možnost jednoduchého přenesení z výzkumu do sériové výroby [4]. Mezi nejvíce využívané polymery pro přípravu biodegradabilních nanovláken patří např. polykaprolakton (PCL) nebo kyselina polymléčná (PLA). Nevýhodou těchto materiálů je jejich vysoká hydrofobicita, se kterou je spojená nízká biokompatibilita, která v tkáňovém inženýrství způsobuje nedostatečné propojení vazeb mezi povrchem nanovlákná a okolní tkání [5]. Tyto nedostatky zabraňují použití nanovláken v medicíně, proto je potřeba povrch nanovláken nějakým způsobem upravit [5].

Modifikace povrchu se provádí např. chemickou cestou [6] nebo pomocí přídavku bioaktivní molekuly (kolagen nebo želatina) do roztoku na elektrostatické zvláknění, anebo depozicí tenké vrstvy plazmového polymeru obsahující polární skupiny jako jsou COOH, NH<sub>2</sub> a OH [5, 7]. Z těchto tří metod se nejvíce využívá depozice pomocí plazmatu (plazmová polymerizace) nebo kombinace plazmové modifikace a následná chemická úprava bioaktivní molekulou (kolagen) ke zlepšení biokompatibility nanovláken [5]. Plazmová polymerizace je tedy ekologická technika nezávislá na substrátu, která umožňuje povrchovou modifikaci nejen nanovláken [8]. Používá se např. k povrchové funkcionalizaci pro zlepšení biokompatibilních vlastností vaskulárních stentů [9] a biosenzorů [10], k modifikaci membrán v okysličovači pro mimotělní oběh [11], k dosažení antibakteriálních vlastností materiálů, [12] atd.

Bylo zjištěno, že PCL nanovlákná mohou být homogenně pokryta aminovými vrstvami za využití plazmové polymerizace netoxického cyklopropylaminu (CPA) [13]. Takto upravené vrstvy vykazují koncentraci NH<sub>x</sub> skupin přes 9 at. %, úhel smáčení se pohybuje v rozmezí od 30 ° do 65 ° a jsou stabilní ve vodném prostředí [13, 14]. Díky takovým vlastnostem je možné použít upravená nanovlákná pro vysazení buněk, a jeví se tak jako perspektivní materiál pro tkáňové inženýrství.

Tato práce se zabývá studiem proliferace buněk hladké svaloviny z cév (VSMC, vascular smooth muscle cells) s modifikovanými PCL nanovlákná. K zajištění lepší proliferace buněk na povrchu nanovláken byla PCL nanovlákná upravena kromě plazmového polymeru také kolagenem. Kolagen je protein extracelulární matrix (ECM), který zajišťuje strukturní a biochemickou podporu pro okolní buňky [15]. Takto upravená nanovlákná by byla vhodným materiálem pro použití v cévním tkáňovém inženýrství, např. pro malé cévní štěpy. [16].

Součástí práce bylo také nanovlákná potáhnout antibakteriální vrstvou kovu. Antibakteriální úprava se provádí např. na nanovlákněch, které nalézají uplatnění jako kryty ran v medicíně. Antibakteriální úprava se provádí zpravidla z vnější strany, aby rána nepřišla do kontaktu s bakteriální infekcí. V této práci byly antibakteriální vlastnosti zajištěny pomocí magnetronového naprašování mědi a vlastnosti vytvořené vrstvy byly následně sledovány.

Teoretická část práce je strukturována podle vrstev, které byly na nanovlákná postupně přidávány. Nejprve mluvíme o elektrostatickém zvláknění, tedy výrobě nanovláken, poté mluvíme o depozici plazmového polymeru a depozici antibakteriální vrstvy, a nakonec se

zmiňujeme o kolagenu a jeho imobilizaci. Poslední blok teoretické práce pojednává o aplikovaných buňkách a používaných analytických metodách, kde kromě buněk VSMC bylo později v práci pracováno také s lidskými keratinocyty (HaCaT), takže jim je věnováno pár slov. Experimentální část a výsledky jsou pak strukturovány obdobně.



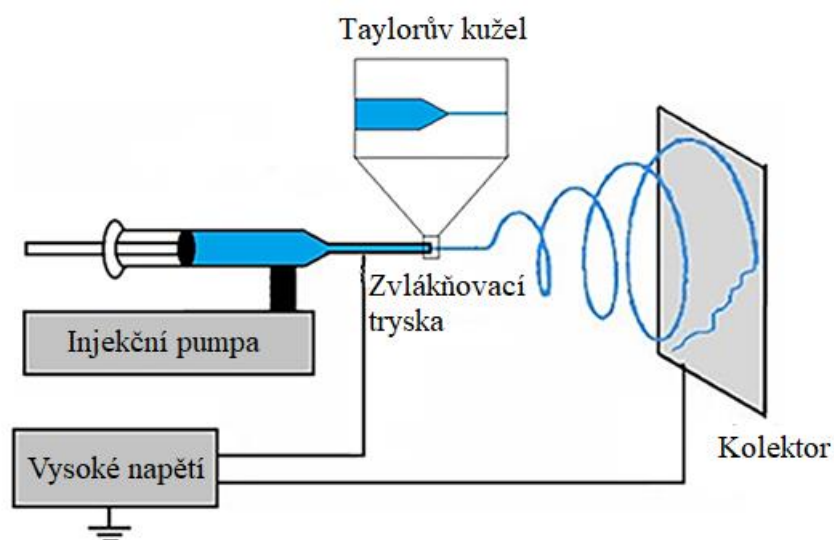
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Nanovláknenné membrány

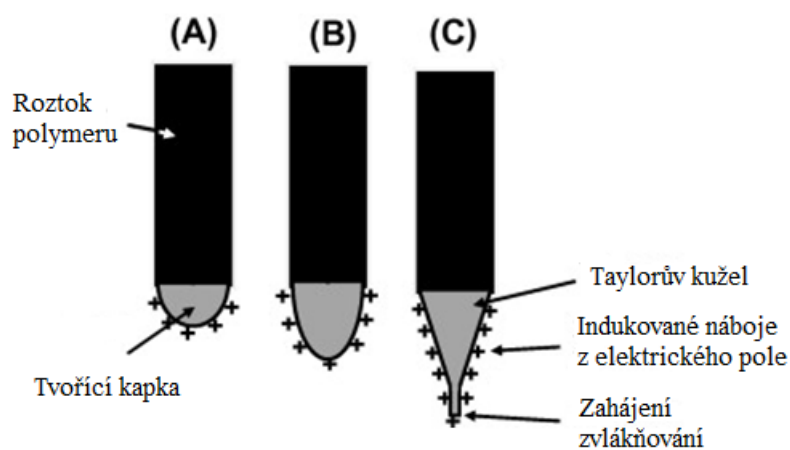
Jednou z největších výzev v regenerativní medicíně je vymyslet vhodný tkáňový nosič (z angl. scaffold), který zajistí stejné nebo podobné vlastnosti jako původní tkáň, případně orgán, takovým způsobem, aby došlo ke kompletnímu zahojení poškozeného místa. Nanovláknenné membrány jsou jednou z možností, které se v tkáňovém inženýrství hojně využívají. Hlavním požadavkem tkáňových nosičů v tkáňovém inženýrství je optimální růst buněk na jejich povrchu. Historicky byly buňky pěstovány a studovány jako monovrstvy v kultivačních miskách. V posledních letech však pokrok v syntéze biomateriálů a mikrofabrikaci umožnil kultivovat buňky v trojrozměrných strukturách. S rozvojem chápání složitých interakcí mezi buňkami a jejich prostředím v tkáních je věnována větší pozornost výrobě tkáňových nosičů, které zahrnují klíčové vlastnosti extracelulární matrix (ECM), který řídí migraci, proliferaci a diferenciaci buněk. ECM se skládá z propletených proteinových vláken jako je kolagen a elastin s průměrem od desítek do stovek nanometrů a obsahuje specifická vazebná místa pro buněčnou adhezi. Komunikace mezi buňkou a ECM probíhá interakcí mezi ligandy v ECM a buněčnými receptory. Nanovláknenné membrány (tkáňový nosič) upravené do podoby nativního ECM mohou řídit chování a osud buňky. Bylo vyvinuto mnoho technik pro výrobu vláknitých tkáňových nosičů, ale nejúčinnější se ukázalo elektrostatické zvlákňování, které má schopnost generovat vlákna podobná strukturám nativního ECM. [17, 18, 19]

#### 2.1.1 Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování je způsob přípravy jemných vláken z polymerní taveniny nebo polymerního roztoku pomocí kapilárních a elektrostatických sil. Pomocí této metody bylo již zvlákňováno na 100 druhů polymerů jak syntetických, tak i přírodních. Během elektrostatického zvlákňování je využíváno vysoké napětí, pomocí kterého je vytvořen elektricky nabitý proud polymerní taveniny nebo roztoku. Polymerní roztok je spojen přímo se zdrojem vysokého napětí a zároveň s protielektrodou, nazývanou kolektor, která je uzemněna (viz Obr. 1). Zdroj vysokého napětí tvoří elektrostatické pole, které formuje elektricky nabitý proud polymerní taveniny nebo roztoku, a to je vypuzeno z kapiláry. Se zvětšováním intenzity elektrického pole se kulovitý tvar kapaliny na hrotu kapiláry prodlouží a vznikne kónický tvar, tzv. Taylorův kužel (viz Obr. 2), který je důsledkem relaxace indukovaného náboje na volném povrchu kapaliny na výstupu ze zvlákňovací trysky. Jakmile je vytvořen Taylorův kužel, nabitá kapalina je pod proudem vystřikována směrem ke kolektoru, který může být buď stacionární plochou deskou, rotujícím válcem nebo souborem trnů nebo disků. V závislosti na viskozitě vystřikované kapaliny je pak vytvářeno vlákno, které se tvoří odpařováním rozpouštědla. To je způsobeno při tzv. bičující nestabilitě, ke které dochází při průletu kapaliny z Taylorova kužele do kolektoru. Výsledkem je pak netkaná nanovláknenná textilie, která je tvořena na povrchu kolektoru. [20, 21, 22] Pro lepší pochopení tvorby nanovláken je třeba vysvětlit ještě teorii vzniku vlákna z kapky na konci kapiláry.



Obr. 1: Schematické znázornění principu elektrostatického zvlákňování. [23]



Obr. 2: Schematické znázornění tvorby Taylorova kužele: (A) Povrchové náboje jsou indukovány v polymerním roztoku v důsledku působení elektrického pole. (B) Postupné prodlužování kapky (C). Deformace kapky na tvar Taylorova kužele v důsledku odpuzování nábojů. Z kužele se následně iniciuje jemný paprsek vláken. [24]

### 2.1.2 Disperzní zákon pro sférickou kapku

Kapka na konci zvlákňovací trysky vytváří polokouli, proto je možné na ni aplikovat disperzní zákon pro sférickou kapku, který zmínil jako první Rayleigh ve své práci v roce 1882 (viz [25]). Definoval, že při určité hodnotě elektrického pole dochází k destabilizaci povrchu kapky, která je i navzdory působícímu povrchovému napětí zvlákněna. Nejprve určil systém elektro-hydrodynamických rovnic, který postupnými výpočty a zjednodušováním uvedl do podoby rovnice (1), a byl tak obdržen disperzní zákon pro sférickou kapku,

$$\omega^2 = \frac{1}{\rho} \frac{l(l-1)}{R_0^2} \left[ \frac{\gamma(l+2)}{R_0} - \varepsilon_0 E_0^2 \right], \quad (1)$$

kde  $\omega$  je disperze světla,  $\gamma$  je povrchové napětí destilované vody,  $R_0$  je poloměr sférické kapky,  $\rho$  je hustota,  $l$  je mód kmitu sférické kapky a  $\varepsilon_0$  je permitivita prostředí. Abychom dosáhli kvalitního elektrostatického zvlákňování z tryskových elektrospinnerů, je nutné udržovat pomocí přesně nastavené intenzity elektrostatického pole mód kmitu kapky  $l$  na nejnižší možné hodnotě. K tvorbě jednoho Taylorova kužele na vrcholu koaxiální kapky je zapotřebí, aby mód kmitu kapky byl roven dvěma ( $l = 2$ ). Pokud však zvýšíme hodnotu  $l$ , dojde k tvorbě většího počtu Taylorových kuželů na vrcholu kapky (viz Obr. 3), což je bráno jako nežádoucí efekt v případě koaxiálního elektrostatického zvlákňování. K tvorbě nanovláken se strukturou jádro-plášť (viz koaxiální zvlákňování) je tedy zapotřebí vytvoření pouze jednoho Taylorova kuželu v místě, kde jsou přítomny obě zvlákňovací složky. [26, 27]

Na základě znalosti disperzního zákona (viz rovnice (1)) je možné určit hodnotu kritického napětí  $E_c$  za podmínky  $\omega^2 = 0$  a  $d\omega^2 / dl = 0$ ,

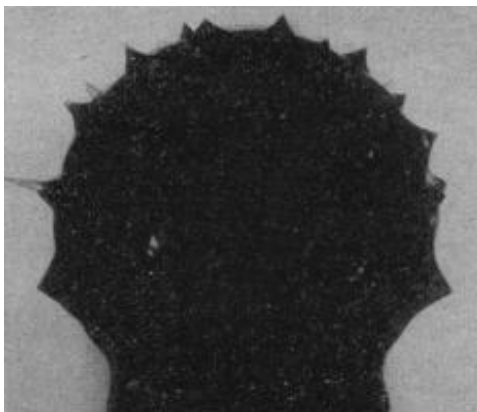
$$E_c = \sqrt{\frac{4\gamma}{\varepsilon_0 R_0}}, \quad (2)$$

kde nad touto hodnotou jsou vlny na povrchu sférické kapky nestabilní a pod touto hodnotou stabilní. Ze znalosti této informace lze odvodit tzv. elektrospinningové číslo  $\Gamma$ , které nám udává, jestli bude nebo nebude docházet k elektrostatickému zvlákňování. Elektrospinningové číslo pak můžeme vyjádřit v podobě rovnice (3), která platí v případě sférické kapky. Pokud je hodnota  $\Gamma > 1$ , pak elektrostatické zvlákňování bude probíhat, v opačném případě však nikoliv. [27]

$$\Gamma = \frac{\sqrt{\varepsilon_0 R_0 E_c}}{2\gamma} \quad (3)$$

Elektrostatické zvlákňování je tedy výrobní technika zahrnující elektrostaticky řízený proces k výrobě elektrostaticky zvlákněných vláken. Průměr těchto vláken se pohybuje od desítek nanometrů až po několik mikrometrů. Výhodou této techniky je její univerzálnost k vytvoření vláken s více uspořádanými strukturami, a tak popularita elektrostatického zvlákňování umožnila v uplynulém desetiletí rozvoj technologií jako je tkáňové inženýrství, regenerativní medicína a enkapsulace bioaktivních molekul. Metoda elektrostatického zvlákňování se dále

dělí na mnoho dalších typů. Zmíníme však jen koaxiální elektrostatické zvlákňování a techniku Nanospider, která pochází z České republiky. [22]

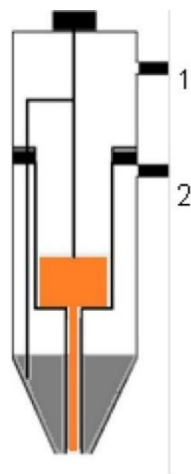


Obr. 3: Tvorba většího počtu Taylorových kuželů v případě vyšší hodnoty  $I$ . [26]

### 2.1.3 Koaxiální elektrostatické zvlákňování

Jedná se o jednu z metod elektrostatického zvlákňování, která je občas označována jako zvlákňování jádro-plášť. Hovoříme o unikátní a vysoce sofistikované metodě s téměř přesně určenou strukturou jádro-plášť. Plášť nanovláknů bývá většinou tvořen polymerním materiálem, zatímco jádro může být tvořeno polymerem nebo jinou hmotou včetně kapalin. Z technologického pohledu vzniká plášť z elektrostaticky zvlákňitelného roztoku, zatímco tekutina, která je používána v jádře, může, ale také nemusí být zvlákňitelná. Koaxiální nanovláknů tedy poskytují neobvyklé možnosti kombinace vlastností a materiálů, které doposud neposkytovala žádná jiná nanovláknů. Koaxiální zvlákňování nastane tehdy, pokud elektrické síly na povrchu polymerního roztoku překročí síly vytvářené povrchovým napětím. Stejně jako u ostatních technik pak vzniká Taylorův kužel a dochází k vypuzení elektricky nabitého proudu polymerního roztoku. Během tzv. bičující nestability se polymerní proud postupně enormně napíná a tvoří se ultrajemná vlákna. Ve srovnání s technologií klasického zvlákňování je u koaxiálního zvlákňování použit jiný druh elektrod, tzv. trysek. Jedná se o trubici (viz Obr. 4) složenou ze dvou odděleně plněných komor, které na vrcholu přechází v koaxiálně uspořádaný výstupní otvor. Hovoříme tedy o dvou kapilárách, kde jedna je uvnitř druhé. [21]

Výhodou této techniky je použití pro materiály, u kterých je složité nebo nemožné je zvlákňovat běžným způsobem. Může být použita např. k inkorporaci aktivních látek, jako jsou antibiotika, imunosupresiva, anestetika, přírodní látky nebo také růstové faktory, které se zvlákňují do jádra koaxiálního biodegradabilního nanovláknů. Výhodou je tak zajištění větší koncentrace dané látky, než je tomu v případě klasických nanovláken a také nanočástic. Inkorporované aktivní látky jsou poté cíleně a řízeně uvolňovány, což je využíváno u aplikací nanovláknenných vrstev a v oblasti kosmetiky a topické léčby. [21]



Obr. 4: Tryska používaná pro koaxiální elektrostatické zvlákňování, (1) vstup vnitřního polymeru, (2) vstup vnějšího polymeru. [21]

#### 2.1.4 Technologie Nanospider™

Jedná se o novou techniku, která byla vyvinuta prof. Jirsákem a Technickou univerzitou v Liberci za spolupráce s firmou Elmarco. Jedná se o jedinečný přístroj k produkování konzistentní tkaniny s průměrem vláken od 50 do 300 nm. Tato jemná vlákna vytváří celkový povrch tkaniny 150krát větší, než je tomu u klasických celulosových vláken. Vlákná jsou připravována v elektrostatickém poli z tenké vrstvy vodného roztoku nebo jiného rozpouštědla. Pomocí Nanospideru lze tedy zvláknit např. PVA (polyvinylalkohol), PUR (polyuretan), PCL (polykaprolakton), chitosan nebo želatinu. [28]

Základní princip Nanospideru je velmi jednoduchý. Hlavní komponentou zařízení je válec (Obr. 5), který se kontinuálně otáčí. Ve spodní části válce je obvykle umístěna vanička s roztokem polymeru, do kterého je válec z půlky ponořen. Na horní části válce se pak tvoří tenká vrstva roztoku polymeru, na které se při zapnutí elektrostatického pole vytváří Taylorovy kužely a dochází tak ke zvlákňování. Výhodou této techniky je, že se tvoří víc Taylorových kuželů, a můžeme tak za stejnou dobu při stejném napětí zvláknit mnohem víc materiálu, než bychom zvlákni u koaxiálního zvlákňování. Taylorovy kužely se vytvoří tehdy, pokud je elektrostatická síla větší než povrchové napětí polymerního roztoku. Z Taylorova kuželu následně vychází jemný proud kapaliny, který se během letu od Taylorova kužele směrem k protielektrodě (kolektoru) odpařuje, a z kapaliny se pak stává pevné nanovlákn. Na kolektoru je zároveň umístěna role s netkanou textilií, na které se vytvářená vlákna uchycují, a je tak vytvářena role nanovláken, která je využita dále na dané aplikace. Celkové schéma znázorňující princip tvorby nanovláken a zachytávání na rolích netkané textilie je zachyceno na Obr. 6. [29]

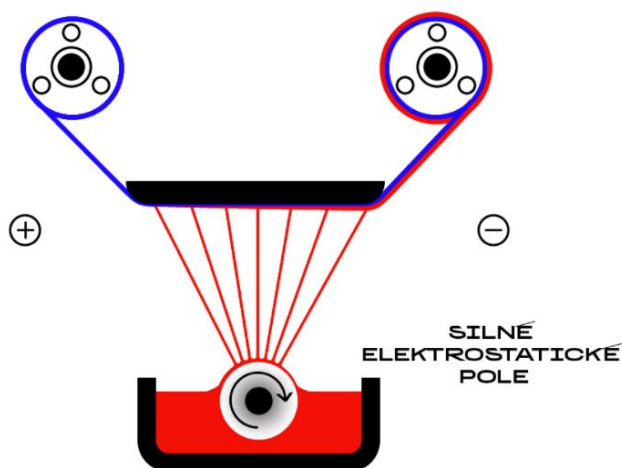
Nanospider™ může fungovat také na principu tzv. strunové elektrody (Obr. 7). Jedná se o stejné zařízení s tím rozdílem, že místo válce je použita elektroda ve tvaru tenké struny. Tato technologie umožňuje zvlákňovat nejen z kapky polymeru procházejícího tryskou do elektrického pole, ale z celé tenké vrstvy roztoku polymeru. Kolem tenké struny se pohybuje tzv. hlava pro nanášení roztoku polymeru, která nanáší zvlákňující roztok po celé délce struny a pohybuje se konstantní rychlostí z jednoho konce na druhý. Vlivem silného elektrického pole se nanovlákná formují z tenké vrstvy polymeru na elektrodě a jsou sbírána na netkanou textilií

stejným způsobem, jako tomu bylo u Nanospideru s válcovou elektrodou. Výhodou strunné elektrody je, že se pro zvlákňování používá malé množství stále čerstvého roztoku, což zajišťuje udržení konstantních parametrů výstupního materiálu při dlouhodobé výrobě. [30]

Vytvořená nanovlákná pak nacházejí uplatnění v textilním průmyslu na tvorbu outdoorového oblečení [31] nebo jako filtry do čističek odpadních vod [32], ale hlavně jako kožní krytí v regenerativní medicíně [20]. Pro dosažení lepších hojivých účinků je v poslední době zaměřen výzkum právě na úpravu povrchu nanovláken a jednou z metod je právě úprava pomocí plazmatu, která zajistí změnu hydrofobního povrchu na hydrofilní. Jelikož se tato práce zabývá úpravou nanovláken pomocí plazmatu, v následující kapitole budou vysvětleny základy teorie plazmatu a jeho aplikace. [33]



Obr. 5: Detailní pohled na Nanospider™, konkrétně na válec na tvorbu nanovláken. [34]



Obr. 6: Schematické zobrazení principu techniky Nanospideru™. [34]



*Obr. 7: Nanospider™ se strunovou elektrodou. [30]*

## 2.2 Plazmové modifikace povrchu materiálů

Plazma je ionizovaný plyn a je také označováno za čtvrté skupenství hmoty. Pojem ionizovaný znamená, že minimálně jeden elektron není vázán v atomu nebo molekule, což způsobí přeměnu atomu nebo molekuly na kladně nabitý iont. Se zvyšující teplotou roste molekulám energie a dochází k přeměně z pevného skupenství do kapalného, následně z kapalného do plynného, a z plynného skupenství na plazma. Díky volným elektronům a iontům je plazma elektricky vodivé (někdy víc než měď a zlato), vnitřně interaktivní a reaguje silně na elektromagnetické pole. Ionizovaný plyn můžeme označit za plazma, pokud je na venek elektricky neutrální a obsahuje značný počet elektricky nabitých částic dostatečných k ovlivnění elektrických vlastností a chování. Elektricky neutrální (neboli kvazineutrální) je plazma v případě, že hustota elektronů je vyvážena hustotou pozitivních iontů. Plazma musí ještě splňovat určitá kritéria, zmíněná v publikaci od Bittencourta. [35, 36]

Jedním z kritérií je tzv. Debyeova délka, veličina, která slouží k porovnání rozměru plazmatu. Pokud vybereme určitou část sledovaného ionizovaného plynu (např. krychli o rozměru  $L$ ) tak, pokud se jedná o plazma, Debyeova délka bude mnohem menší než rozměr  $L$ . Debyeova délka je vyjádřena vztahem

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 k T_e}{e^2 n_e}} \ll L, \quad (4)$$

kde  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $\epsilon_0$  je permitivita vakua,  $n_e$  je koncentrace elektronů,  $T$  je teplota elektronu a  $e$  je elementární náboj. [36]

Pokud se jedná o plazma, tak Debyeova délka určuje porovnání v rámci velikosti. Pro porovnání plazmatu v závislosti na čase se zavádí veličina plazmová frekvence  $\omega_{pl}$ . Jedná se o frekvenci oscilací a vln v plazmatu. Souvisí s pohybem elektronů na pozadí iontů, kde vratnou silou je Coulombova elektrická síla vznikající vychýlením souboru elektronů oproti souboru iontů. Pohyb elektronů je tak rychlý, že kladně nabití ionty se ze svého místa ani nepohnou, takže jsou považovány za stabilní a pracuje se pouze s koncentrací elektronů. [37] Tento proces je vyjádřen vztahem (5), kde  $m_e$  je hmotnost elektronů.

$$\omega_{pl} = \sqrt{\frac{ne^2}{\epsilon_0 m_e}} \quad (5)$$

V souvislosti s plazmovou frekvencí je třeba zmínit i srážkovou frekvenci. Pokud jsou oscilace elektronů v plazmatu potlačovány díky srážkám mezi neutrálními částicemi a elektrony, tak není splněno kritérium plazmatu a nejedná se o plazma. Kritérium je formulováno tak, že plazmová frekvence ( $\omega_{pl}$ ) musí být větší než srážková frekvence ( $\nu_c$ ), nebo že součin střední doby mezi srážkami s neutrálními atomy ( $\tau$ ) a plazmové frekvence ( $\omega_{pl}$ ) musí být větší než jedna, kde obě vyjádření jsou popsána v rovnicích (6) a (7). [38]

$$\omega_{pl} \gg \nu_c \quad (6)$$



$$\omega_{pl}\tau > 1 \quad (7)$$

V této práci se využívá plazma elektrického výboje v plynu, kde je aplikováno elektrické pole na ionizovaný plyn. Elektrické pole urychluje volné elektrony, které naráží do ostatních atomů a ionizují je. Aplikované elektrické pole dodává účinněji energii elektronům než iontům, proto je teplota elektronů v elektrickém výboji mnohem vyšší než teplota iontů. Dodáním dostatečné energie jsou molekuly disociovány na atomy, a následně až na ionty, za tvorby ionizovaného plynu, který je kvazineutrální.

Plazma je v praxi široce využíváno. Je velmi atraktivní pro aplikace v chemii a příbuzných oborech, protože teplota některých složek plazmatu a hustota energie výrazně převyšuje teploty v konvenčních chemických technologiích. Dále je plazma schopno produkovat vysoké koncentrace energeticky a chemicky aktivních komponent jako jsou elektrony, ionty, atomy a radikály, fotony s různou vlnovou délkou a excitované stavy. A v neposlední řadě plazma může být daleko od termodynamické rovnováhy, což umožňuje výskyt extrémně vysokých koncentrací chemicky aktivních látek, a zároveň je zajištěna v systému pokojová teplota. Tyto vlastnosti plazmatu umožňují významné zesílení účinnosti chemických procesů a často stimulaci chemických reakcí, které by za normálních podmínek v konvenční chemii nebyly vůbec proveditelné. [35]

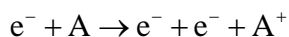
### 2.2.1 Reakce v plazmatu

Stejně jako v jakémkoli jiném plynu probíhá v plazmatu řada reakcí. Teplota v plazmatu je určena průměrnými energiemi plazmatických částic (neutrálních a nabitých) a jejich příslušnými stupni volnosti (translační, rotační, vibrační a ty co souvisejí s elektronickou excitací). Plazma je tedy schopno vykazovat více teplot. U elektrických výbojů, které se používají pro generování plazmatu v laboratořích, se energie z elektrického pole nejprve akumuluje elektrony mezi srážkami a následně se přenáší z elektronů na těžké částice. Pro lepší pochopení interakce částic v plazmatu je třeba vysvětlit, k čemu dochází při střetu elektronu s atomem anebo s molekulou. [35]

#### 2.2.1.1 Atomové kolize

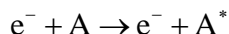
V homogenním plazmatu podléhají elektrony kolizi s neutrály k produkci excitovaných neutrálních, atomů, volných radikálů, iontů a dalších elektronů. Kvůli velkému rozdílu hmotností je možné na proces srážky elektronu a částice pohlížet jako na elastickou kolizi. Při srážce elektronu s atomem dochází k několika možným interakcím, zmíněny budou však jen některé. [39]

##### 1) Ionizace nárazem elektronu:



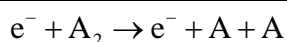
Elektrony s dostatečnou energií mohou vyrazit elektron z atomu a produkovat jeden další elektron a iont. Tento elektron může být znovu urychlen, a po dosažení dostatečné energie může ionizovat další atom. Tento proces zajišťuje kontinuální produkci ionizovaných částic a plazma je tak udržováno. Ionizační procesy mají obecně nejvyšší energetické bariéry kolem 10 eV. [39]

2) Excitace nárazem elektronu:



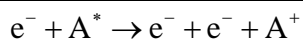
Elektrony s dostatečnou energií mohou také excitovat elektrony atomu z nižší energetické hladiny do vyšší energetické hladiny. Tento proces produkuje excitované částice, jejichž chemická reaktivita k povrchu se může zcela lišit od atomů základního stavu. Minimální energie potřebná k produkci excitovaných částic se liší v závislosti na molekule a typu excitace. Některé excitované atomy mají dlouhou životnost (až 10 ms), protože výběrová pravidla zakazují relaxaci do základního stavu. Tyto excitované atomy jsou označovány jako metastabilní. [39]

3) Disociace dvouatomových molekul nárazem elektronu:



Elektrony s dostatečnou energií mohou také rozbít chemické vazby molekuly za tvorby dvou atomů. Tyto atomy mohou získat dostatek energie a být na vyšší energetické hladině než atomy základního stavu. Disociační procesy mají obvykle nižší prahové energie než ionizační procesy a pohybují se od 0 do 10 eV v závislosti na síle vazby, která je přerušena, a mechanismu, kterým je proces prováděn. Tento proces disociace je většinou zodpovědný za produkci chemicky aktivních radikálů ve většině plazmatu. [39]

4) Elektronová metastabilní ionizace:



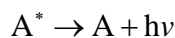
Elektrony s dostatečnou energií mohou také odstranit elektron z metastabilního atomu za produkce iontu a dalšího elektronu. Protože metastabilní atom je již excitován, je zapotřebí k provedení této reakce nižší energie. [39]

5) Ionizace neutrálního a metastabilního atomu:



Metastabilní atom se může srazit s neutrálním atomem a ionizovat ho. Může se tak stát, pokud ionizační energie neutrálního atomu je menší než excitační energie metastabilního atomu. [39]

6) Deexcitace:



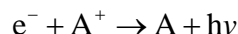
Excitovaný stav atomu je obvykle nestabilní a elektronová konfigurace se může navrátit do základního stavu spolu s vyzářením fotonu o specifické energii, která se rovná rozdílu mezi kvantovými hladinami. [39]

7) Rekombinace elektron-iont:



Pro rekombinaci elektron-iont musí být přítomna třetí složka k zachování energie a hybnosti. Tou bývá obvykle neutrální atom nebo stěna reaktoru. Tento proces rekombinace vede ke vzniku excitovaného atomu. [39]

### 8) Radiační rekombinace:



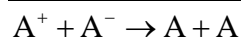
Foton může být také generován během procesu rekombinace. Jedná se také o tříložkovou rekombinaci, protože koalescence dvou těles je nepravděpodobná z hlediska zachování energie a hybnosti. [39]

### 9) Uchycení elektronu:



Elektron se může přichytit k elektronegativnímu atomu za tvorby negativního iontu (např. k halogenu nebo atomu kyslíku). [39]

### 10) Iont-iont rekombinace:

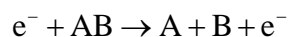


Při iont-iont rekombinaci dochází k přenosu jednoho elektronu za tvorby dvou neutrálů. K této reakci dochází zřídka. [39]

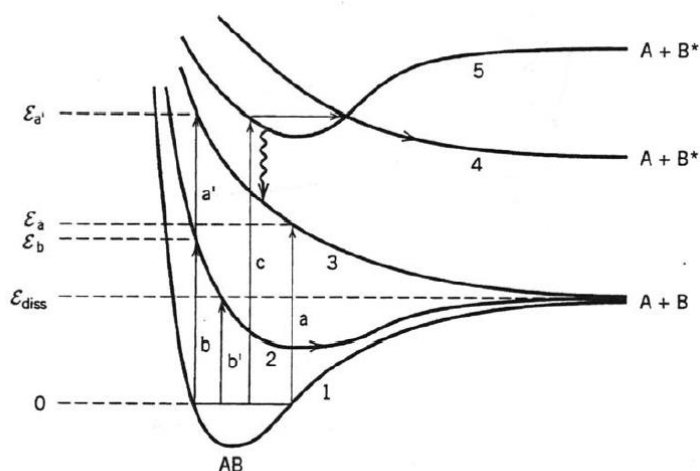
## 2.2.1.2 Molekulární kolize

Stejně jako atomy i molekuly emitují fotony, když podléhají přechodu mezi různými energetickými hladinami. V molekulách jsou však možné další způsoby pohybu, a to rotace a vibrace molekul. Proto u kolize molekul s elektrony dochází k odlišným reakcím. [39]

### 1) Disociace:

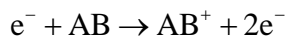


Na Obr. 8 jsou znázorněny různé procesy, které vedou k disociaci v molekulách. Procesy b a b' vedou k excitaci do stavu, kde excitovaná molekula není stabilní. To má za následek produkci A + B atomů, kde přebytek energie je přeměňován na translační energii molekulárních fragmentů. Excitace do křivky 2 s nižší energií má za následek vázaný elektricky excitovaný stav. Excitace do křivky 3, která je odpudivá, je indikováno procesy aa'. Výsledkem excitace je produkce A + B. Excitace c označuje excitaci do excitovaného stavu, který je stabilní. Tento stav může přejít na křivku 3 díky emisi fotonu, což vede k disociaci, anebo může přejít do odpudivého stavu (křivka 4), což způsobí opět disociaci, ale B je produkován v excitovaném stavu B\*. [39]

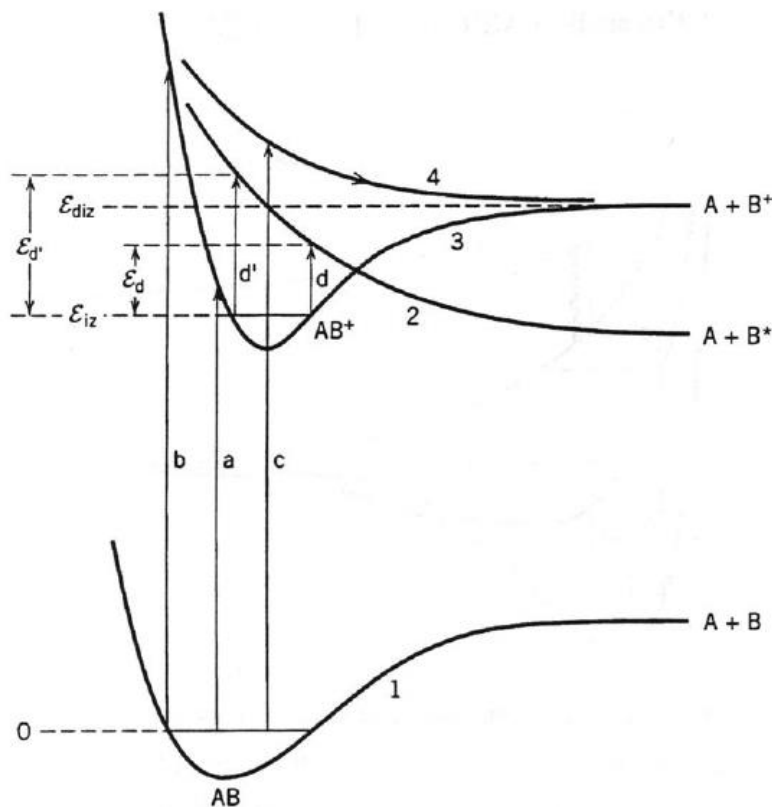


Obr. 8: Disociační proces. [39]

## 2) Disociační ionizace:

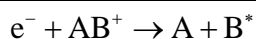


Na Obr. 9 jsou procesy spojené s ionizací a disociační ionizací. Křivka 2 představuje stabilní stav molekulárních iontů ( $AB^+$ ). Tento stav může podlehnout disociační rekombinaci za produkce neutrálního a excitovaného fragmentu. Odpudivý iontový stav je zobrazen na křivce 4, která vždy vede k fragmentaci po ionizaci. [39]



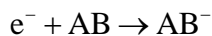
Obr. 9: Disociační ionizace a disociační rekombinační procesy. [39]

## 3) Disociační rekombinace:



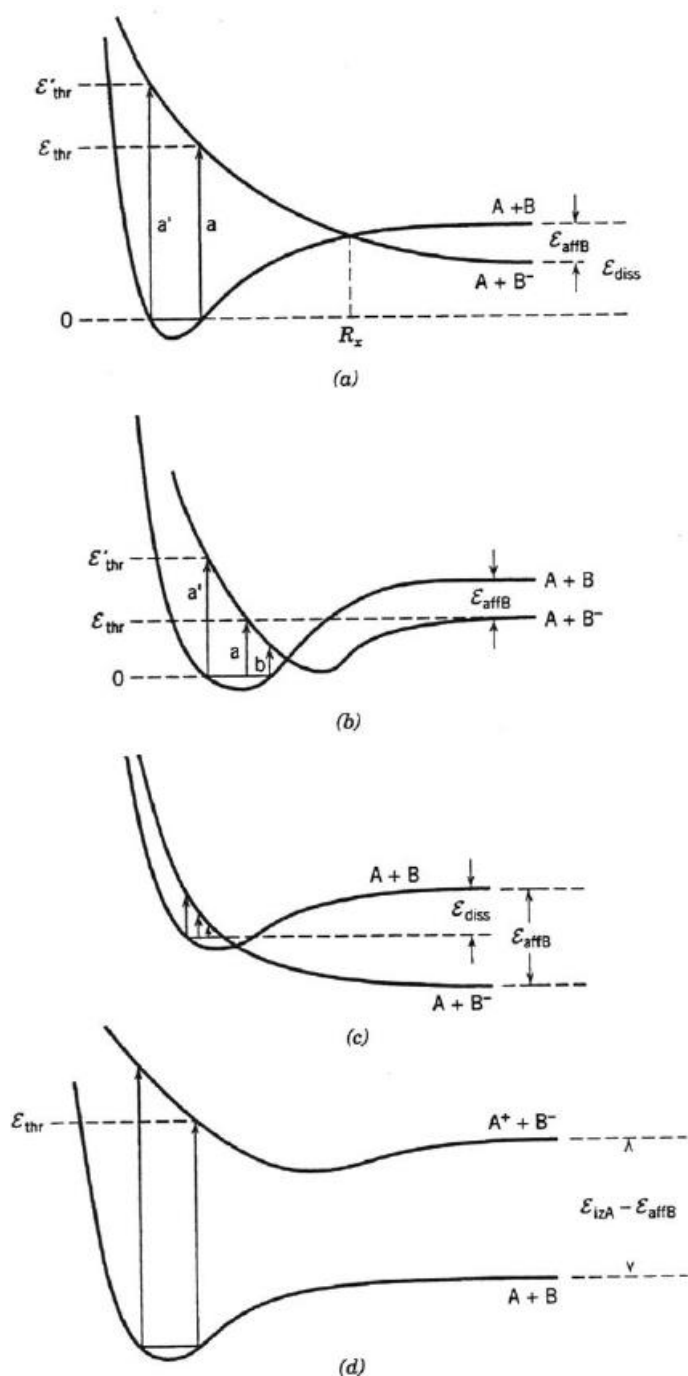
Kolize elektronů znázorněná na Obr. 9 jako d a d' představuje zachycení elektronu vedoucího k disociaci molekuly. Tento proces je označován jako disociační rekombinace. [39]

## 4) Disociační uchycení elektronu:



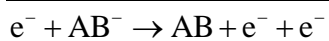
V závislosti na disociační energii a elektronové afinitě B lze disociační uchycení elektronu kategorizovat na automatické oddělení, disociační oddělení, elektron disociační uchycení a polární disociaci. Na Obr. 10 je zachycena řada příkladů procesů připojení elektronu k molekule. U obrázku (a) excitace do odpudivého stavu vyžaduje energii elektronu větší, než je prahová energie. U obrázku (b) uchycení elektronu vyžaduje malou energii elektronů, což produkuje stabilní negativní ion nebo fragmentaci. Obrázek (c) znázorňuje zachycení pomalého elektronu do odpudivého stavu, což vede ke vzniku záporného iontu, který je zároveň

fragmentem. Obrázek (d) znázorňuje excitaci do neutrálního excitovaného stavu s dostatečnou energií za současné tvorby kladného a záporného iontu. Tento jev je označován jako polární disociace. [39]



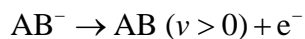
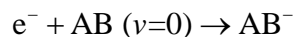
Obr. 10: Proces uchycení elektronu zobrazující uchycení elektronu v a) odpudivém stavu b) přitažlivém stavu c) odpudivém stavu s pomalými elektrony d) polární disociaci. [39]

##### 5) Oddělení elektronu srážkou:



Srážka elektronu s negativním iontem může mít za následek oddělení elektronu za vzniku neutrální molekuly a dalšího elektronu. Důležitou roli zde hraje elektronová afinita záporného iontu. [39]

6) Vibrační a rotační excitace:



Elektrony s dostatečnou energií mohou excitovat molekuly do vyšších vibračních a rotačních energetických hladin. Jedná se o dvoustupňový proces, kdy se nejprve zachytí elektron za tvorby negativního iontu, a poté se elektron oddělí a vytvoří vibračně excitovanou molekulu. [39]

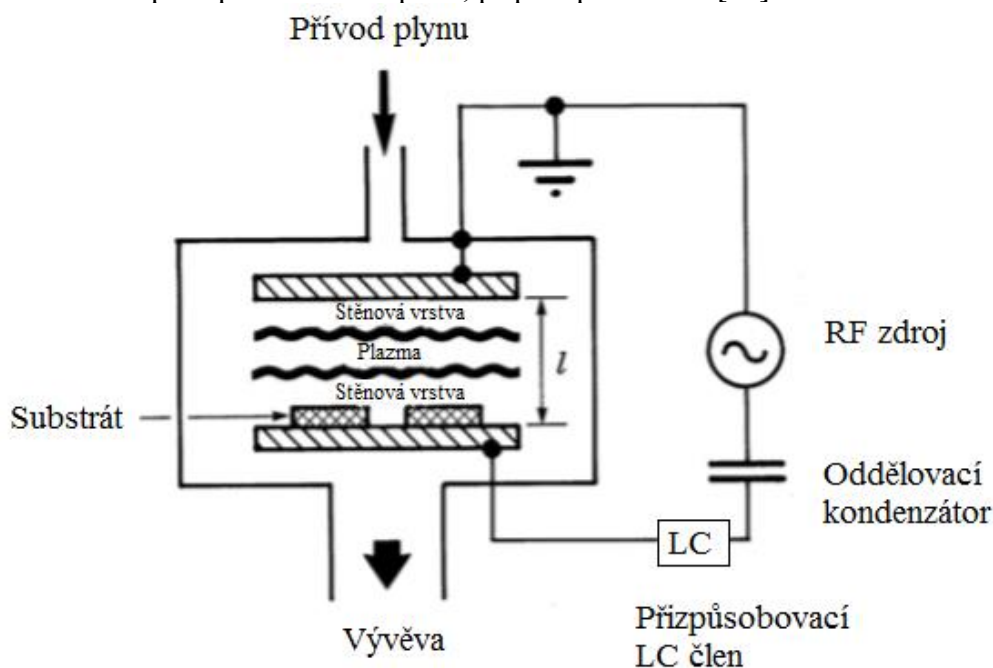
Jako mnoho typů reakcí, existuje také mnoho typů plazmatu a tato práce využívá tzv. nerovnovážné plazma, kde neutrální atomy, elektrony, ionty a molekuly nejsou v termodynamické rovnováze. K vytvoření tohoto plazmatu je využíván tzv. kapacitně vázaný doutnavý výboj, který je popsán v následující kapitole.

## 2.2.2 Kapacitně vázaný doutnavý výboj

Kapacitně vázaný doutnavý výboj je druh samostatného doutnavého výboje, který je generován vysokofrekvenčním zdrojem v radiofrekvenčním elektrickém poli mezi dvěma nebo více elektrodami. V této práci se doutnavý výboj využíval pro depozici tenkých vrstev. Pro ionizaci plynu se použilo střídavé napětí, protože stejnosměrné napětí způsobuje polarizaci elektrod a nabíjení rostoucí vrstvy. Doutnavý výboj se dělí podle přivedeného výkonu do plazmatu na indukčně vázaný doutnavý výboj (ICP) a kapacitně vázaný doutnavý výboj (CCP). ICP se tvoří v plazmové hlavici, což je obvykle měděná cívka obalující trubici, uvnitř které je generováno plazma, a to je udržováno pomocí průchodu plynu. Cívkou prochází proud, a to způsobí generování magnetického pole. Volným elektronům je následně dodávána energie pomocí elektromagnetického pole, a ty pak mají dostatečnou kinetickou energii na ionizaci plynu, což ve výsledku vytvoří ICP. Na rozdíl od toho je u CCP vysokofrekvenční výkon vyvážen do plazmatu přes kapacitní stěnovou vrstvu náboje, a protože byl v práci využíván pouze CCP, budeme se zabývat pouze jím. [40]

Typicky se pracuje za nízkého tlaku okolo 50 Pa a o přiváděném radiofrekvenčním napětí v rozmezí od 100 do 1000 V. Výboj se uskutečňuje v tzv. plazmovém reaktoru, ve kterém je teplota elektronů zhruba 3 eV (cca. 35 000 K) a který je většinou připojen přes přizpůsobovací LC člen a oddělovací kondenzátor k radiofrekvenčnímu generátoru (viz Obr. 11). Přizpůsobovací člen zajišťuje, aby výstupní impedance generátoru byla stejná jako výsledná impedance zátěže a oddělovací kondenzátor zabráňuje toku stejnosměrného proudu elektrickým obvodem. Tím je zajištěna minimalizace odraženého výkonu dodávaného do plazmatu. [38]

Při CCP vzniká na buzené elektrodě záporné napětí, které je označováno jako samopředpětí  $U_b$ , což se projeví zrychlením toku iontů směrem k povrchu. Pokud zanedbáme srážky ve stěnové vrstvě, tak mají ionty optimální energii pro bombardování povrchu. Tento jev můžeme pozorovat např. v plazmovém leptání, příp. naprašování. [37]

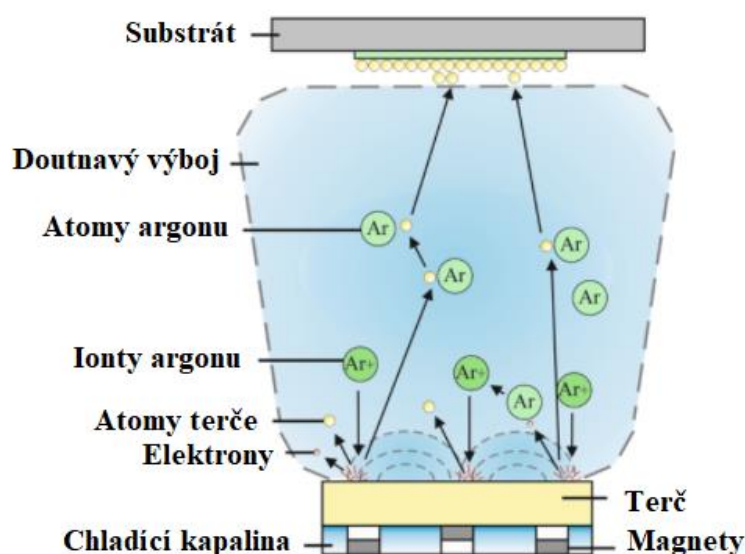


Obr. 11: Schéma uspořádání kapacitně vázaného výboje, převzato a částečně upraveno. [38]

### 2.2.3 Depozice magnetronovým naprašováním

Naprašování je depoziční technika, která spadá do kategorie fyzikální depozice z plynné fáze (PVD). PVD se od plazmochemické depozice z plynné fáze (PECVD) liší v tom, že se zpravidla využívá deponovaný materiál v pevném skupenství. Magnetronové naprašování jako deponovaný materiál používá terč z vodivého materiálu. Tento terč je umístěn do vakuované komory a je na něj přiváděno vysoké záporné napětí. Do vakuované komory je také kontinuálně přiváděn pracovní plyn (obvykle argon) a hodnota tlaku je udržována od desítek po jednotky Pa. Substrát je umístěn naproti terči a mezi ně je aplikováno stejnosměrné napětí. Tím dojde k zapálení doutnavého výboje, který způsobí ionizaci pracovního plynu. Vzniklé kladné ionty jsou přitahovány k terči, který bombardují. Tato srážka iontu s terčem odštěpí atom terče do prostoru. Tyto atomy pak putují směrem k substrátu, na kterém začnou kondenzovat. Se vzrůstajícím počtem atomů na substrátu se atomy začnou na sebe vázat na molekulární úrovni a vytvoří pevně vázanou vrstvu. Množství vrstev atomů na substrátu může být řízeno dobou rozprašování, což nám ve výsledku umožní vyrobit tenkovrstvou strukturu o požadované tloušťce. Od terče jsou uvolňovány také elektrony, které směrem k substrátu narážejí na atomy argonu a vytváří se další ionty pracovního plynu, které opět míří k terči s cílem dalšího rozprašení atomů terče. [41, 42]

Magnetronové naprašování je rozšířeno o magnetické pole působící v blízkosti terče, které způsobuje pohyb elektronů po spirále podél magnetických siločar (viz Obr. 12). Elektrony se tak pohybují v blízkosti terče a nejsou přitahovány k substrátu. Výhodou toho je, že plazma vzniká jenom v blízkosti terče a nedochází k poškození vznikajícího filmu na substrátu. Aplikace magnetického pole také způsobí, že se zvýší ionizace atomů argonu, protože elektrony se pohybují po delší dráze, a celkově to způsobí zvýšení účinnosti naprašování. Magnetronové naprašování může být také uplatněno na nevodivý terč. Zde je však potřeba použít střídavý vysokofrekvenční signál, protože se na povrchu hromadí náboj, který zabraňuje dalšímu bombardování. Během první půl periody se tedy nejprve rozprašuje terč a následně během druhé půl periody dochází k vybíjení kvůli opačné polaritě náboje. [41]



Obr. 12: Schematické zobrazení procesu probíhajícího během magnetronového naprašování. [42]



Magnetronové naprašování bylo v práci použito k depozici antibakteriální vrstvy mědi na nanovlákněch. Antibakteriální vlastnosti mědi byly prokázány v publikaci *Antibacterial properties of copper and its alloys* [43], takže naším cílem bylo na nanovlákně nadeponovat měď, aniž by došlo k poškození nebo k výrazným strukturním změnám nanovláken. Inspirovali jsme se článkem *PLLA scaffold modification using sputtering of the copper target to provide antibacterial properties* [44], kde jako depoziční metodu pro nanosení Cu na nanovlákně použili magnetronové naprašování. V této publikaci bylo také zmíněno, že po magnetronovém naprašování Cu na povrchu nanovláken zoxидуje na CuO, což je bráno jako negativní jev. CuO totiž vykazuje horší antibakteriální vlastnosti oproti samotné mědi. Tento negativní jev však vyřešili umístěním vláken do autoklávu. Po sterilizaci autoklávem pozorovali na modifikovaných nanovlákněch změnu v barvě z černé na žlutou, z čehož usoudili, že došlo k následující reakci:  $\text{CuO} + \text{CO} \rightarrow \text{Cu} + \text{CO}_2$ . Podařilo se jim tedy na povrch modifikovat pouze Cu, a ne jeho oxid. Dále také prokázali, že depozice magnetronovým naprašováním nemá vliv na hydrofobicitu povrchu nanovláken. Tyto poznatky hrály důležitou roli pro náš typ vláken, proto byla jako depoziční technika zvolena metoda magnetronového naprašování. [44] Místo mědi může být jako antibakteriální prvek použito Ag nebo  $\text{TiO}_2$ , jak je zmíněno v publikaci [45], ale jelikož Cu je z ekonomického hlediska přívětivější, bylo pracováno pouze s ní.

#### 2.2.4 Plazmochemická depozice z plynné fáze

Plazmochemická depozice z plynné fáze (PECVD – Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) je metoda k přípravě tenkých vrstev. Základ techniky byl odvozen od podobného postupu, a to CVD (Chemical Vapor Deposition), u které plynné reaktanty (nebo páry kapaliny) reagují s další molekulou za vysoké teploty v plynné fázi k tvorbě nové molekuly. Ta vytvoří vrstvu na požadovaném povrchu. Např. při tvorbě vrstvy  $\text{SiO}_2$  se do komory zavede  $\text{SnCl}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (viz [46]). Aktivační energie tak u CVD pochází ze zahřívání směsi a reakce probíhá v termodynamické rovnováze. [47]

U PECVD je rozdíl v tom, že veškeré reakce probíhají za nízké teploty. Je to způsobeno tím, že v plazmatu elektrony způsobují excitaci a disociaci molekul reaktantů, čímž je dodána potřebná aktivační energie. U PECVD lze použít méně toxické látky, které by u CVD nebyly schopné zreagovat. Např. cyklopropylamin (CPA), použitý v této práci, by musel být podroben velmi vysokým teplotám, aby bylo možné rozštěpit jednoduché vazby mezi uhlíky. Další výhodou PECVD je možnost deponovat na teplotně citlivé substráty jako jsou nanovlákně, která bychom nemohli použít při CVD kvůli vysokým teplotám. Jediná nevýhoda PECVD je komplexnost reakcí probíhajících v plazmatu. To znamená, že i pro relativně jednoduché reaktanty můžeme pozorovat stovky různých reakcí a tvorbu odlišných produktů, což je obtížné popsat či predikovat. [47]

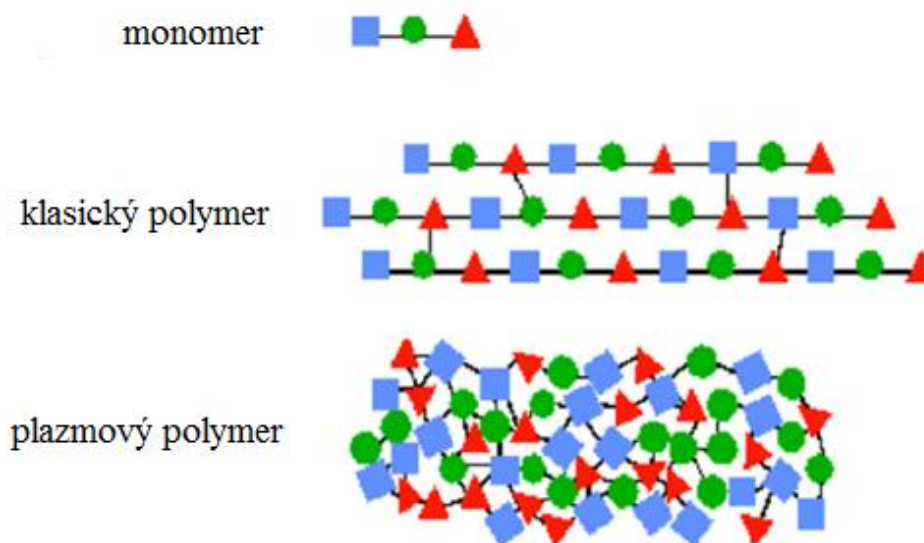
##### 2.2.4.1 Plazmová polymerizace

Plazmová polymerizace je podtřídou PECVD, která se používá na přípravu tenkých organických vrstev. Ty tvoří tzv. plazmový polymer (PP), který má odlišné chemické i fyzikální vlastnosti, než kdyby byl vytvořen pomocí klasické polymerizace. Klasický polymer se skládá z pravidelných jednotek – merů, které vznikají v průběhu polymerizace z molekuly monomeru. Monomer je tedy sloučenina tvořená molekulami, obsahující nejméně jednu dvojnou vazbu nebo dvě funkční skupiny, které vzájemnou reakcí vytvoří polymer. Molekula monomeru se

tedy přemění na konstituční jednotku polymeru (mer), což je uskutečňováno ve třech fázích: iniciaci, propagaci a terminaci. Naproti tomu plazmové polymery netvoří pravidelnou strukturu, ale jsou silně síťované a větvené, protože v průběhu plazmové polymerizace dochází k fragmentaci molekuly monomeru na velký počet rozdílných částí. Schematické znázornění rozdílů mezi jednotlivými polymery je zobrazeno na Obr. 13. [48, 49]

Sledováním plazmových polymerů se zabývala spousta vědců, např. Linder a Davis, kteří popsali syntézu několika plazmových polymerů. [50] S největším objevem však přišel Hirotsugu Yasuda, který navrhl mechanismus založený na fragmentaci monomeru v plazmatu a zároveň jeho radikálovou rekombinaci na sledovaném povrchu. Připodobnil plazmovou polymerizaci k radikálové polymerizaci a vytvořil tzv. řídicí parametr pro plazmovou polymerizaci  $Y$ . Ten spolu s geometrickým faktorem a aktivační energií polymeru určuje depoziční rychlost. Parametr  $Y$  vystihuje rovnice (8), kde  $M$  značí molární hmotnost monomeru,  $W$  výkon a  $F$  průtok monomeru. V této práci byly připraveny aminové plazmové polymery, proto jim v následující kapitole věnujeme pár slov. [51]

$$Y = \frac{W}{MF} \quad (8)$$



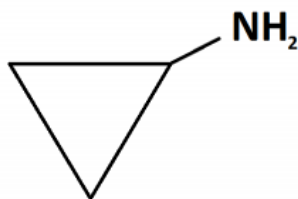
Obr. 13: Schematické porovnání výstavby monomeru, klasického polymeru a plazmového polymeru připraveného plazmovou polymerizací. Převzato a částečně upraveno. [52]

### 2.2.5 Plazmové aminové polymery

Plazmové aminové polymery jsou polymery, které ve své struktuře obsahují primární nebo sekundární aminy ( $-\text{NH}_2$ ,  $=\text{NH}$ ) a další dusíkaté skupiny, které ve výsledku plazmovému polymeru dávají kladný náboj. V důsledku toho se mohou vázat např. s  $\text{COOH}$  skupinou, která má záporný náboj a je přítomná v molekulách proteinů (např. kolagen) nebo v buněčných membránách. Ve výsledku se tedy vytvoří silné kovalentní vazby, což má uplatnění v řadě biomedicínských aplikací, např. v imobilizaci proteinů. [53] Výhodou plazmových aminových polymerů je, že za optimálních podmínek lze dosáhnout stability ve vodném prostředí, a lze je tak použít např. k buněčné adhezi. [54] Jedním z monomerů poskytující vznik PP je allylamin. Bylo však prokázáno, že tyto PP po ponoření do vody ztrácí až 90 % své tloušťky a snižuje se u nich koncentrace dusíku. [55] Alternativou je použití heptylaminu [56], směsi amoniaku a acetylenu [57] a cyklopropylaminu (CPA) jako monomeru. [58]

V této práci byl použit právě CPA (Obr. 14), který je na rozdíl od allylaminu netoxický, vytvořené vrstvy obsahují asi 9 at. %  $\text{NH}_x$  skupin a po ponoření do vody na 48 h vykazují ztrátu vrstvy jen asi 20 %. Po překročení této doby se ztráta vrstvy již nemění. [55] CPA je kapalina s tenzí par 32 kPa při teplotě 20 °C a za normálních podmínek je nereaktivní. Protože však na něj působíme radiofrekvenčním výbojem v kapacitně vázaném plazmatu, tak jsme schopni ho rozštěpit na radikály a použít k vytvoření aminových PP. [55]

PP z CPA obsahují nespočet aminových skupin, což bylo potvrzeno v publikaci *Cyclopropylamine plasma polymer surfaces for label-free SPR and QCM immunosensing of Salmonella*. [59] Na základě FTIR spektra bylo zjištěno, že PP obsahují aminy ( $-\text{NH}_2$ ,  $>\text{NH}$ ), iminy ( $-\text{CH}=\text{NH}$ ) a enaminy ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{NH}_2$ ). Dále obsahují také nitrily, isonitrily a další nenasycené vazby ( $-\text{C}\equiv\text{N}$ ,  $-\text{N}\equiv\text{C}-$ ,  $-\text{N}=\text{C}=\text{N}-$ ,  $-\text{C}=\text{C}=\text{N}-$  nebo  $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ). Z toho důvodu jsou PP vysoce reaktivní a lze tak na ně navázat molekuly obsahující  $\text{COOH}$  skupinu. Tuto podmínku splňují právě proteiny extracelulární matrix (ECM), např. kolagen, který je předmětem této práce.



Obr. 14: Strukturní vzorec cyklopropylaminu.

## 2.3 Proteiny extracelulární matrix

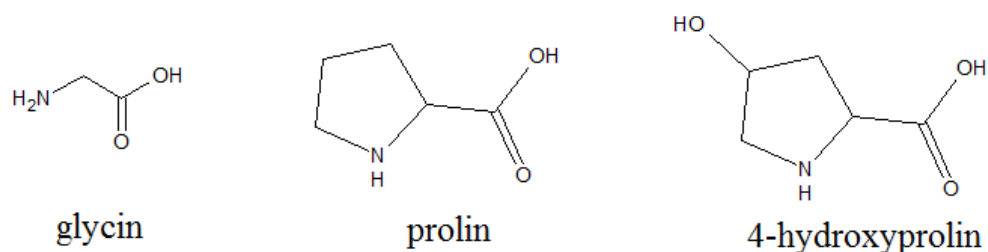
Proteiny ECM jsou látky, které se vyskytují v mezibuněčném prostoru. ECM je velmi uspořádaná a organizovaná síť nebuněčných komponent, která se vyskytuje ve všech orgánech a tkáních. Tvoří stabilní strukturu, na které jsou upevněny buňky, a reguluje buněčné procesy, jako je např. migrace, růst, diferenciace, morfogeneze a homeostáza. Hlavními komponentami ECM jsou vláknenné proteiny jako elastin, fibronectin a kolagen. A právě kolagen se vyskytuje ve většině tkání v největším zastoupení. [60]

### 2.3.1 Kolagen

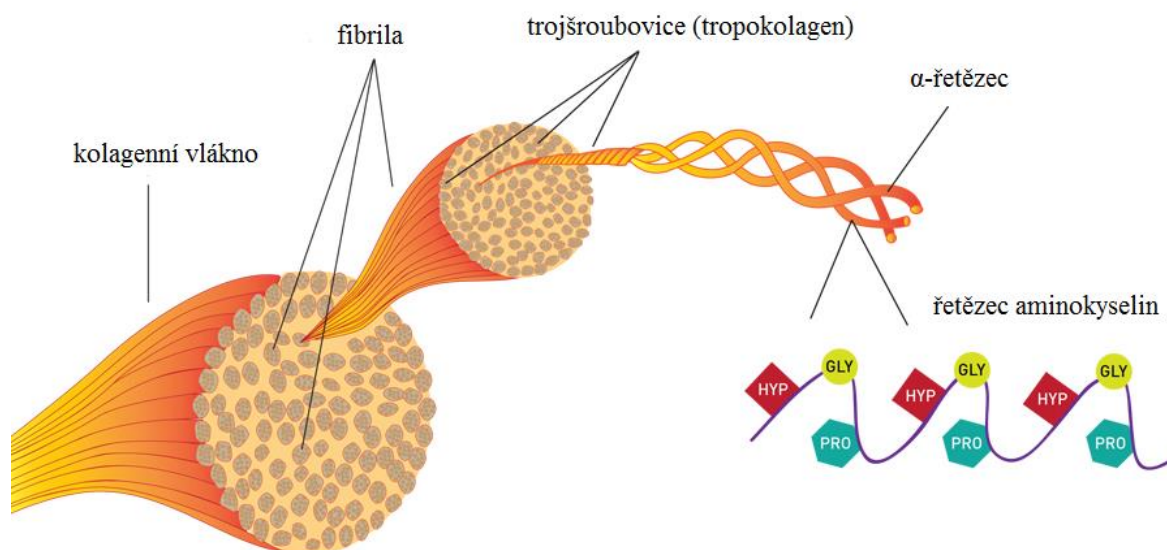
Kolagen je vláknitý protein vylučovaný převážně fibroblasty, který tvoří přibližně 30% zastoupení všech proteinů vyskytujících se v těle člověka. Je rozdělen na 28 různých typů, kde každý typ kolagenu je tvořen ze 46 různých polypeptidových řetězců ( $\alpha$ -řetězců). Nejvíce zastoupeným typem je kolagen I, který je základní stavební jednotkou tkáně. Vyskytuje se v kůži, šlachách a kostech. Odlišností mezi jednotlivými typy kolagenů je např. přerušovaná struktura trojitě šroubovice. To je patrné u transmembránových kolagenů, kde dlouhé úseky přerušené struktury hrají důležitou roli v buněčné signalizaci a adhezi buněk. [60]

Struktura kolagenu se skládá ze tří polypeptidových  $\alpha$ -řetězců tvořící pravotočivou šroubovici tzv. tropokolagen. Jednotlivé  $\alpha$ -řetězce jsou složeny převážně z glycinu, prolinu a 4-hydroxyprolinu (Obr. 15), kde se pořadí aminokyselin u jednotlivých typů kolagenu liší. V důsledku přítomnosti prolinu, glycinu a hydroxyprolinu mají  $\alpha$ -řetězce tendenci tvořit levotočivé šroubovice bez vzniku vodíkových vazeb v rámci jednoho řetězce. Interakce mezi jednotlivými řetězci navzájem je odlišná. Vodíky z molekuly glycinu jsou orientovány dovnitř kruhu trojšroubovice a tvoří vazbu se sousedním  $\alpha$ -řetězcem. Celý tropokolagen vypadá tak, že vodíky jsou směřovány dovnitř kruhu a tzv. „kruhy“ z molekuly prolinu a hydroxyprolinu jsou orientovány vně. Toto uspořádání způsobuje pevnější a bližší vazby v trojšroubovici. Tropokolageny se následně spojují ve větší celky, které dají vznik kolagenním vláknům (Obr. 16). [60]

V této práci byl používán kolagen typu I patřící mezi tzv. fibrilární kolageny. [61] Mezi ně patří kolageny typu I, II, III, V, XI, XXIV a XXVII. Nejvíce jsou rozšířeny ve tkáních, kterým poskytují velkou pevnost v tahu. Na základě této znalosti a dalších jiných (např. přirozené prostředí pro růst buněk) byla v této práci zkoumána imobilizace kolagenu a také imobilizace kolagenu na nadeponované vrstvě plazmového polymeru na nanovlákněch.



Obr. 15: Strukturní vzorce jednotlivých molekul přítomných v molekule kolagenu, nakresleno v programu ACD/ChemSketch.



Obr. 16: Strukturní složení kolagenního vlákna, převzato a částečně upraveno. [62]

### 2.3.2 Imobilizace kolagenu

Povrchové vlastnosti biomateriálu hrají důležitou roli vzhledem k biokompatibilitě a biologické reakci mezi buňkami a navrženým biomateriálem. Biomateriál musí splňovat také základní vlastnosti jako je mechanická pevnost, netoxičita, biokompatibilita případně biodegradabilita, vhodná 3D struktura, apod. Vzhledem k těmto požadavkům je nutné povrch biomateriálu často modifikovat. [63]

Je známo, že proteiny mohou změnit svou strukturu na základě interakcí mezi povrchem a proteinem. Změna konformace po adsorpci na povrch závisí na hodnotě pH, hydrofobicitě nebo hydrofilitě a klíčovou roli hrají iontová síla, přítomnost specifických iontů, koncentrace kolagenu a teplota. Povrch, na který chceme imobilizovat kolagen, se musí upravit. Hojně se používá úprava pomocí plazmatu. Např. v publikaci *The Study of Collagen Immobilization on a Novel Nanocomposite to Enhance Cell Adhesion and Growth* imobilizovali kolagen na nanokompozity, kde nejprve povrch nanokompozitu podrobili úpravě kyslíkovým plazmatem. Povrch nanokompozitu se tak stal hydrofilní a kolagen v kapalně formě nanесли na povrch a imobilizovali 12 hodin. [64] V další publikaci *Collagen immobilization on polyethylene terephthalate surface after helium plasma treatment* pro imobilizaci kolagenu použili úpravu heliovým plazmatem. Jako substrát měli polyethylentereftalát (PET), kde po úpravě plazmatem kolagen nanесли formou roztoku na povrch. Roztok kolagenu (pH 3,4) obsahoval fosfátový pufr (PBS) a celková imobilizace byla prováděna 24 h při 24 °C. [65] Pro imobilizaci kolagenu se kromě plazmatu využívá chemická úprava. V publikaci *Collagen immobilization on ultra-thin nanofiber membrane to promote in vitro endothelial monolayer formation* imobilizovali kolagen na PCL nanovlákná. Nejprve však byla PCL vlákna ponořena do roztoku NaOH k zajištění hydrofilních vlastností a navázali na PCL vlákna 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid/sulfo-N-hydroxysulfosukcinimid. Po chemické úpravě PCL vlákna imobilizovali kolagen v 2-[N-morpholino]ethansulfonovém (MES) pufru. [66] Alternativou může být zvláknění kolagenu spolu s PCL nanovláknem, ale je zde riziko denaturace kolagenu při zvláknění. [67] V této práci jsme se výše uvedenými

publikacemi inspirovali, a pro úpravu povrchu nanovláken jsme použili kombinaci chemické úpravy a úpravy plazmatem tzv. PECVD metodu (viz výše).

V přirozené tkáni jsou buňky obklopeny ECM, lze tedy předpokládat, že pokud povrch materiálu obsahuje vazebná místa podobná přirozené ECM, buňky budou interagovat s materiálem na stejné úrovni. Teoreticky buňky rozpoznají implantát (biomateriál) jako by byl součástí těla. Bylo zjištěno, že materiály s imobilizovaným kolagenem na povrchu zvyšují přilnavost a proliferaci různých typů buněk. [68, 69] Na základě tohoto poznatku byly v práci využívány buňky hladkého cévního svalstva, abychom blíže pochopili interakci biomateriálu s prostředím, do kterého by se teoreticky dal implantovat. [63]

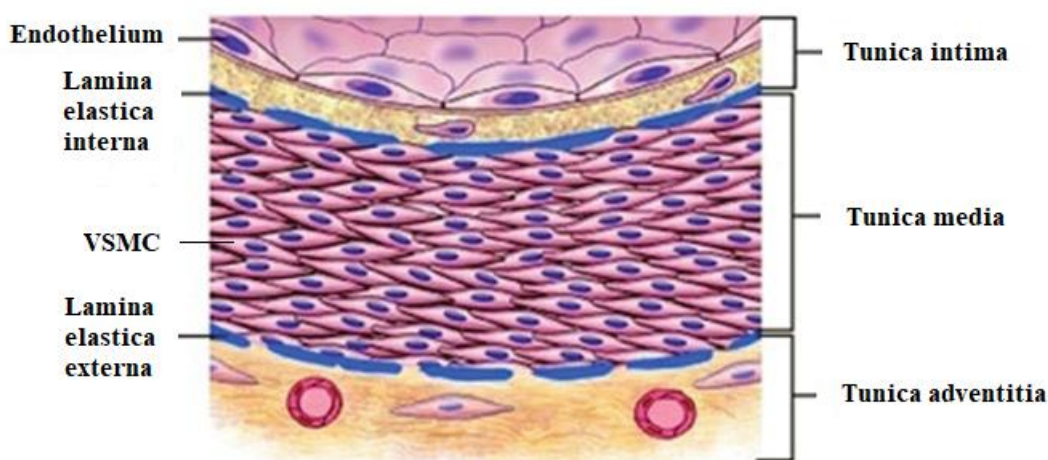


## 2.4 Buňky studované v této práci

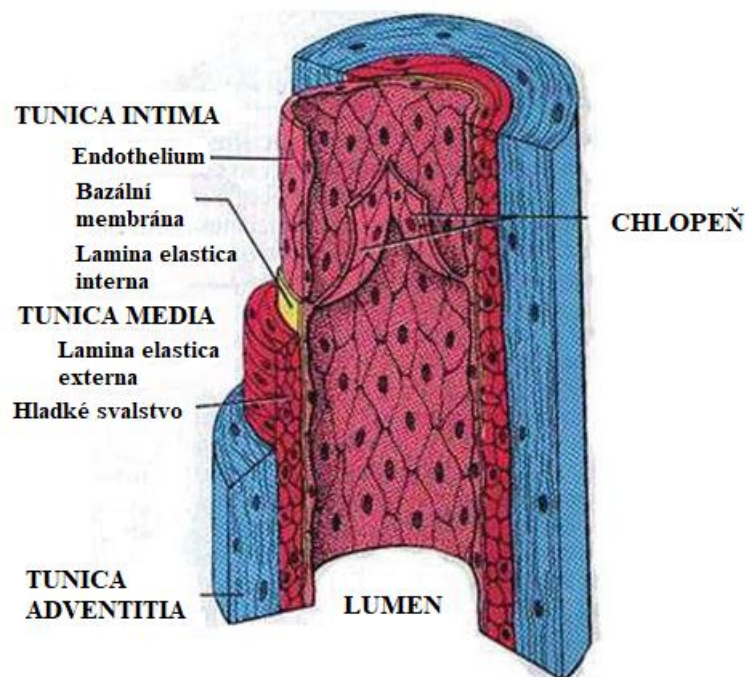
### 2.4.1 Buňky hladkého cévního svalstva

Buňky hladkého cévního svalstva (VSMC) jsou důležitou komponentou krevních cév. Nachází se v prostřední části (tunica media) cévy, kde jsou orientovány v kruhu kolem cévního lumenu a tvoří četné vrstvy. V malých cévách je jich cca 40 a ve velkých 60 vrstev. Tunica media je umístěna mezi tunica intima a tunica adventitia a jednotlivé vrstvy jsou od sebe odděleny membránami lamina elastica interna a lamina elastica externa. Tunica intima obsahuje semipermeabilní monovrstvu endotelových buněk a tvoří lumenální část cévy, která je v kontaktu s krví. Tunica adventitia (vnější část cévy) obsahuje fibroblasty nervy, a ve větších cévách také malé cévy zásobující cévní stěnu vasa vasorum. Schematické zobrazení cévní stěny je na Obr. 17. Tato struktura je podobná v tepnách a žilách s tím rozdílem, že tunica media je v žilách tenčí kvůli nižšímu krevnímu tlaku v žilním lůžku a tunica intima obsahuje v některých žilách chlopně k zadržení toku krve v jednom směru (viz Obr. 18). [70]

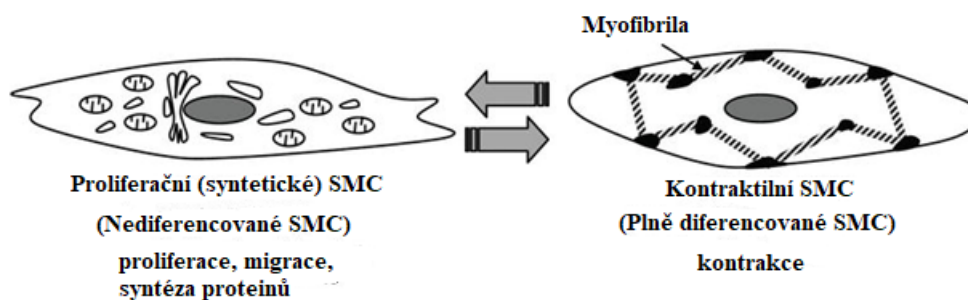
V práci byly využívány VSMC izolované z hrudní aorty 8 týdnů starých samců potkanů. VSMC mají důležitou roli ve fyziologickém fungování cév a také při patologických změnách. Ve zdravých cévách VSMC zajišťují, aby se cévy stahovaly a natahovaly a přispívají tak k regulaci krevního oběhu. Ve zdravých cévách jsou VSMC v klidovém neproliferujícím fenotypu, tzv. kontraktilním fenotypu. Je zastoupen hojnými kontraktilními vlákny a proteiny specifickými pro VSMC jako jsou  $\alpha$ -izoforma aktinu a izoformy SM-1 a SM-2 řetězce myosinu. [71, 72] Za patologických podmínek přecházejí z kontraktilního fenotypu na syntetický fenotyp charakterizovaný ztrátou kontraktilních vláken a přidružených molekul a zvýšenou tvorbou organel spojených s proteosyntézou (Obr. 19). V syntetickém fenotypu jsou VSMC aktivní v migraci a růstu, což může vést k intimálnímu zesílení, tvorbě aterosklerotických plaků, zesílení stěny cév během hypertenze, a nakonec k stenóze nebo k úplnému ucpání cévního lumenu. [71, 72, 73] K podobným změnám ve VSMC dochází také po cévní chirurgii a při kultivaci VSMC *in vitro*, zejména za běžných statických podmínek ve standardním médiu s přídavkem séra, proto je třeba na to brát zřetel. [70, 72]



Obr. 17: Schematické zobrazení anatomie cévní stěny. [70]



Obr. 18: Schematické znázornění anatomie žilní stěny. [70]



Obr. 19: Přechod mezi kontraktilním a syntetickým fenotypem VSMC. [73]

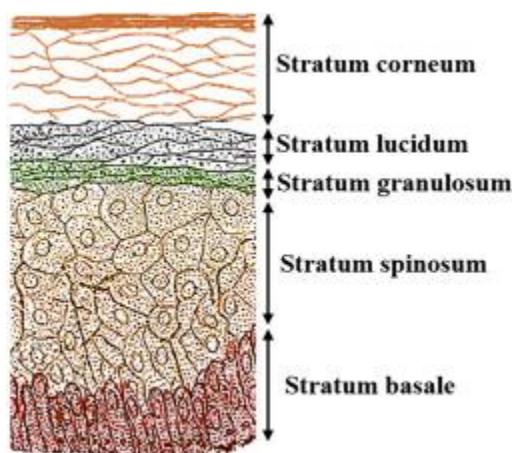
K porovnání adheze buněk na modifikovaném povrchu nanovláken byly také použity keratinocyty, konkrétně HaCaT buňky. Tyto buňky byly zvoleny, abychom potvrdili, že prostředí s kolagenem vyhovuje většině buněk a také k ověření, že by se modifikovaný povrch mohl eventuálně využít jako obvaz, případně jako náhrada kůže.



### 2.4.2 Keratinocyty

Jsou primárním typem buněk v epidermis, periferní vrstvě kůže. Tloušťka epidermis se pohybuje od 0,05 mm do 0,8 mm a zhruba 90 % buněk přítomných v epidermis jsou keratinocyty. Ty jsou v neustálém pohybu ze spodních vrstev do vrchních vrstev epidermis. Vrstvy jsou tvořeny buňkami s různými stadii zrání keratinu a jsou jimi stratum basale (bazální vrstva), stratum spinosum (trnitá buněčná vrstva), stratum granulosum (granulární buněčná vrstva), stratum lucidum a stratum corneum (vrchní buněčná vrstva) (viz Obr. 20). Stratum corneum generuje nepropustný povrch kůže a má hlavní roli v obraně proti mikrobiální kolonizaci jako aktivátor imunitních odpovědí. Z toho důvodu se keratinocyty využívají jako složky kožních implantátů. Mají také schopnost produkovat antimikrobiální peptidy jako je  $\beta$ -defensin, psoriasin a širokou škálu cytokinů schopných aktivovat imunitní odpovědi. Epidermis obsahuje antigen prezentující buňky, které jsou schopné aktivovat T-lymfocyty na buněčně zprostředkované a humorálně adaptivní odpovědi. [74, 75, 76]

V této práci byly použity lidské keratinocyty (HaCaT). Jedná se o spontánně transformovanou aneuploidní imortalizovanou buněčnou linii z kůže dospělého člověka, která je široce používána ve vědeckém výzkumu. Jsou využívány pro vysokou kapacitu, diferenciaci a proliferaci *in vitro*. Jejich použití ve výzkumu umožňuje charakterizaci lidských keratinocytů podle modelu, který je reprodukovatelný a řeší problémy jako je krátká životnost kultury a variace mezi buněčnými liniemi, které by se jinak vyskytly. [77, 78]



Obr. 20: Schematické znázornění složení epidermis. [75]

## 2.5 Principy použitých analytických metod

### 2.5.1 Rentgenová fotoelektronová spektroskopie

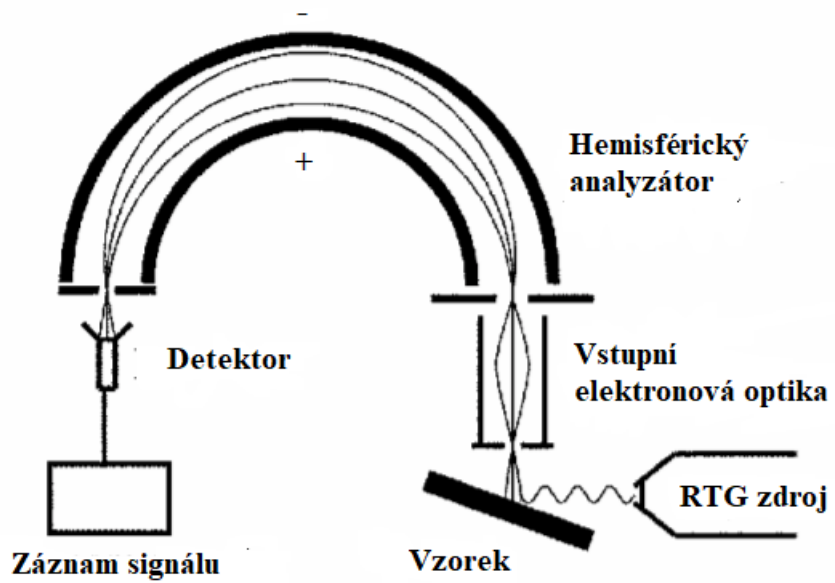
Rentgenová fotoelektronová spektroskopie neboli XPS je metoda pro charakterizaci povrchů a ultratenkých filmů. Data získaná z XPS poskytují kvantifikované složení vnější vrstvy materiálu, řádově několik nanometrů. Popisuje jak přítomnost, tak chemický stav jednotlivých prvků v materiálu. [79]

XPS je založena na tzv. fotoelektrickém jevu. Pokud fotony elektromagnetického záření dopadnou na povrch materiálu, vyvolá to předání energie mezi elektrony obsaženými v látce a mezi fotony. Pokud je předaná energie dostatečně velká, může dojít k uvolnění elektronu z vazby v obalu atomu. Rovnice popisující tento jev je znázorněna na (9), kde  $E_k$  je kinetická energie,  $h\nu$  energie dopadajícího záření a  $E_b$  označuje vazebnou energii elektronu v látce.  $E_b$  je tedy energie potřebná k uvolnění z vnitřního orbitalu na Fermiho hladinu. Člen  $\Phi$  označuje výstupní práci, tedy energii potřebnou k uvolnění elektronu z Fermiho hladiny na energetickou hladinu odpovídající vakuu, což je hladina, kde elektron již není vázán. Po uvolnění elektronu následuje v excitovaném atomu přechod elektronu z vyšší energetické hladiny na uvolněnou hladinu. Přebytková energie se vyzáří fluorescencí sekundárního rentgenového záření. Po interakci rentgenového záření s povrchem může také dojít k Augerově jevu, kde uvolněná energie z přechodu elektronů ve vnitřních slupkách slouží k uvolnění elektronu z vnější slupky. Tyto elektrony se označují jako Augerovy elektrony a lze je ve fotoelektronovém spektru pozorovat. Elektrony ve spektru se tedy liší na základě své kinetické energie. [80]

$$E_k = h\nu - E_b - \Phi \quad (9)$$

Zdrojem záření je tedy v XPS rentgenový paprsek, který ozařuje místo na vzorku. Dopadem záření se odštěpí elektrony z povrchu materiálu a jsou emitovány do analyzátoru. V analyzátoru jsou elektrony stáčeny k detektoru a zároveň se kontinuálně měří kinetická energie elektronů. Elektrony následně dopadají na detektor, kde jsou počítány. Výsledkem je XPS spektrum (závislost počtu elektronů na vazebné energii), ze kterého lze určit vazby, chemické skupiny a celkové chemické složení povrchu vzorku. Schematické zobrazení principu je zachyceno na Obr. 21. Analyzátor může pracovat také v režimu tzv. paralelního zobrazování, který je založen na paralelním sbírání elektronů se specifickou hodnotou energie a 2D projekci na detektoru. Získaný obrázek obsahuje chemické informace a lze jej použít k nastavení přesného umístění pro spektroskopii malé oblasti. XPS je provozována za velmi vysokého vakua (cca  $10^{-9}$  mbar), aby se zabránilo kolizím elektronů s jinými částicemi, než se dostanou do detektoru. [81, 82]

XPS je zásadní nástroj pro porozumění chemii povrchů a používá se v široké škále průmyslových odvětví a aplikací. K pochopení materiálu není vždy dostačující použití pouze jedné techniky, proto je zapotřebí dalších analýz. [79]



Obr. 21: Schematický nákres XPS aparatury. [82]

## 2.5.2 Skenovací elektronová mikroskopie

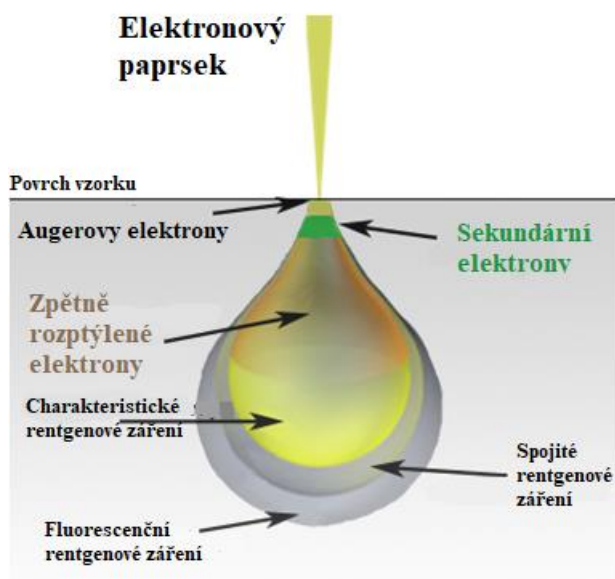
Skenovací elektronová mikroskopie (Obr. 22), neboli SEM, je jedna z nejpoužívanějších zobrazovacích technik na zkoumání a analýzu. Jedním z důvodů je jeho rozlišení, které se pohybuje okolo 10 nm (Pokročilejší SEM mohou dosáhnout rozlišení až 2,5 nm.). SEM lze také využít v kombinaci s dalšími technikami, jako např. s energeticky disperzními mikroanalýzami (EDX, EDS, EDAX), které jsou využívány pro stanovení složení nebo orientace jednotlivých krystalů nebo částic. [83]

Podstatou SEM je detekce elektronů, kde jako zdroj elektronů se obecně používají žhavená wolframová vlákna jako zdroj elektronů v elektronových dělech. Produkované elektrony jsou urychlovány a prochází kombinací elektromagnetických čoček za vzniku zaostřeného svazku elektronů, který dopadá na vzorek. Vzorek se vkládá na stolek v oblasti komory mikroskopu. Poloha elektronového paprsku na vzorek je řízena cívkami umístěnými nad objektivem, které umožňují skenování paprsku přes povrch vzorku. V důsledku interakce elektronů se vzorkem se vytváří řada signálů, které lze použít k získání informací o povrchové topografii a složení. [84]

Jak elektrony interagují se vzorkem, vytváří se sekundární elektrony, zpětně odražené elektrony a charakteristické rentgenové paprsky, které slouží k detekci chemického složení v EDS. Elektronový paprsek při interakci s povrchem vzorku pronikne do hloubky několika mikronů v závislosti na urychlujícím napětí a hustotě vzorku. Mnoho signálů, jako jsou sekundární elektrony a rentgenové paprsky, je následně produkováno jako výsledek této interakce uvnitř vzorku. Signály jsou sbírány jedním nebo více detektory a formují obrazy, které jsou následně zobrazeny na monitoru počítače jako fotky. Podrobné schéma interakce elektronového paprsku se vzorkem je znázorněno na Obr. 23. [84]



Obr. 22: Skenovací elektronový mikroskop TESCAN Lyra3. [85]

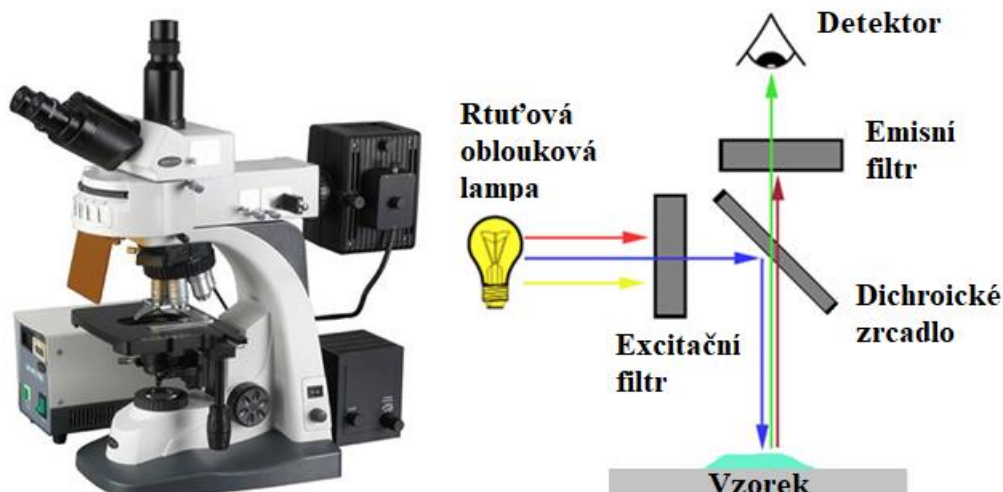


Obr. 23: Schematické zobrazení interakce elektronového paprsku se vzorkem. [84]

### 2.5.3 Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskop je podobný optickému mikroskopu s tím rozdílem, že optický mikroskop pracuje se světlem o vlnové délce 400-700 nm k osvětlení a vytvoření zvětšeného obrazu vzorku, kdežto fluorescenční mikroskop pracuje s mnohem vyšší intenzitou světla, což excituje fluorescenční látku ve vzorku. Fluorescenční látka pak emituje záření s nižší energií a větší vlnovou délkou oproti původnímu zdroji světla. Mikroskop se nejvíce využívá pro zobrazování strukturních komponent malých vzorků, jako jsou buňky, k provádění testů životaschopnosti buněk nebo k zobrazování genetického materiálu v buňce. [86]

Princip fluorescenční mikroskopie je závislý na fluorescenci vzorku. Proto je ve většině případů vzorek označen fluorescenční látkou (fluoroforem). Dopadající záření na vzorek je absorbováno fluoroforem a následně je emitováno záření s delší vlnovou délkou o nižší energii. Fluorescenční záření lze oddělit od okolního světla příslušnými filtry, takže pozorovatel vidí pouze fluorescenci. [86] Na Obr. 24 pak můžeme vidět fluorescenční mikroskop spolu se schematickým zobrazením průchodu světelného záření mikroskopem. Světelným zdrojem je většinou xenonová nebo rtuťová výbojka nebo wolframová halogenová žárovka s širokým rozsahem emisního pásu. Jak již bylo řečeno, světlo prochází excitačním filtrem, kde se vybere světlo o příslušné vlnové délce, a následně se světlo odráží na dichroickém zrcadle a směřuje na vzorek. Pokud se jako zdroj záření používá laser, tak excitační filtr není nutný. Emitované záření (fluorescence) ze vzorku opět prochází dichroickým zrcadlem a emisním filtrem, kde posléze dochází k detekci. Pro různé typy fluorescenčních barviv je tedy potřeba volit různé sady filtrů. [87]



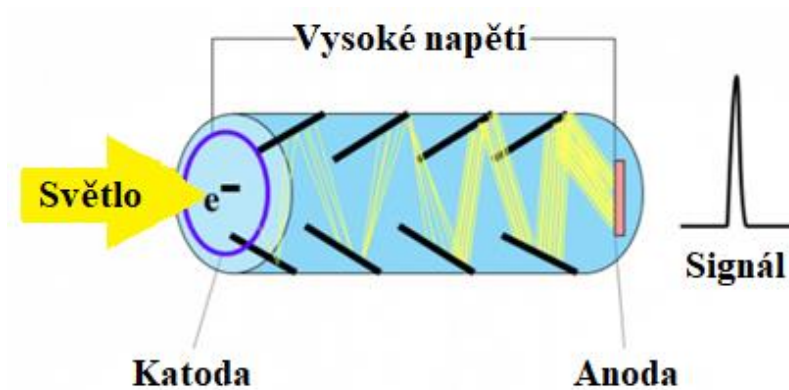
Obr. 24: Fluorescenční mikroskop vlevo a schematické zobrazení principu mikroskopu vpravo. [88]

## 2.5.4 Luminometr

Luminometr je přístroj, který měří slabé emise světla pocházejícího ze vzorku pomocí fotonásobiče. Jedná se o velmi citlivé zařízení (Obr. 25), které se používá k měření velmi malého množství světla (několik málo fotonů). Pracuje s malým objemem vzorků (řádově  $\mu\text{l}$ ) a lze ho využít např. na vyhodnocení proteinových roztoků nebo suspenzi buněk obsažených v mikrocetrifugační zkumavce nebo v mikrodestičce. K detekci fotonů se používají fotonásobičové trubice (Obr. 26), které zesilují příchozí signály, takže lze detekovat i desítky fotonů. Fotony dopadají na katodu a produkují elektrony v důsledku fotoelektrického jevu. Ty jsou následně urychleny vysokým napětím a znásobeny pomocí dynod. Znásobené elektrony následně dopadají na anodu připojenou k obvodu pro zpracování výstupu a dochází k detekci. Jsou dva druhy obvodů pro zpracování výstupu. Obvod, který převádí příchozí signál na puls (režim počítání fotonů) a obvod, který převádí signál na analogový proud (proudový režim). Režim počítání fotonů poskytuje lepší citlivost, a je tak vhodný pro měření luminiscence, zatímco analogový režim pracuje lépe s větší intenzitou světla, a je tak vhodný pro měření fluorescence. Oba režimy byly využity v této práci jako vyhodnocovací technika proliferace buněk na modifikovaných površích (viz níže). [89]



Obr. 25: Luminometr Hidex Sense Multiplate Reader. [90]



Obr. 26: Schematické zobrazení fotonásobičové trubice a násobení fotonů. [89]

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité materiály

V této práci byla použita řada materiálů a chemikálií. Na výrobu PCL nanovláken byl použit polykaprolakton (molekulová hmotnost 80000 g/mol), kyselina octová (99 %) a kyselina mravenčí (98 %) (Sigma Aldrich s.r.o. – St. Louis, Missouri, USA). Na modifikaci PCL nanovláken byl použit argon o čistotě 99,998 % (Messer Technogas s.r.o. – Bad Soden am Taunus, Německo), páry cyklopropylaminu od firmy Sigma Aldrich s.r.o. o čistotě 98 %. Jako další substrát pro depozici byl použit oboustranně leštěný křemík dopovaný borem o tloušťce 605  $\mu\text{m}$ , odporu 7  $\Omega\text{cm}$  a s orientací krystalu 100. Na imobilizaci byl používán kolagen z telecí kůže od firmy Sigma Aldrich s.r.o., který byl rozpuštěn v kyselině octové (99,8 %) (PENTA s.r.o. – Praha, Česká republika) s čistotou p.a. (pro analýzu) naředěné na koncentraci 0,1 mol·l<sup>-1</sup>. Pro přípravu roztoků byl také použit fosfátový pufr (PBS), který byl připraven smícháním 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 2,31 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O a doplněním destilovanou H<sub>2</sub>O do 1 l. V práci byly používány VSMC (Fyziologický ústav AV ČR) a HaCaT buňky (Expasy, Švýcarsko). Pro kultivaci buněk bylo použito Dulbecovo modifikované Eaglovo médium (DMEM) od firmy Sigma Aldrich s.r.o. s přidavkem 10 % FBS (fetální hovězí sérum, Gibco, Thermo Fisher Scientific – Waltham, Massachusetts, USA), 1,2 mM L-glutaminu (Gibco, Thermo Fisher Scientific), a 100 U/ml Penicilinu/Streptomycinu (HyClone – Logan, Utah, USA; Thermo Fisher Scientific). Pro enzymatické uvolnění buněk z povrchu se používal Trypsin-EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová; Biotech, Onsala, Švédsko). Na vyhodnocení proliferace byl použit lyzační pufr Somatic cell ATP releasing reagent (Sigma Aldrich) a ATP mix (BioThema, Handen, Švédsko), jehož obsahem je směs luciferázy s luciferinem. V práci byl také využíván resazurin (Sigma Aldrich s.r.o.) a Hoechstovo barvivo – bisBenzimide H 33342 trihydrochloride (Sigma Aldrich s.r.o.).

#### 3.2 Elektrostatické zvláknění nanovláken

Nanovlákná, která byla použita jako substrát pro kultivaci buněk, byla připravena elektrostatickým zvlákněním roztoku PCL. Granulovaný polymer PCL byl rozpuštěn ve směsi kyseliny octové a kyseliny mravenčí v poměru 2:1. Výsledná koncentrace PCL byla 9 hmot. %. Připravený roztok byl míchán po dobu 24 hodin za pokojové teploty a poté byl elektrostaticky zvlákněn pomocí přístroje Nanospider™ NSLAB 500 (ELMARCO). Roztok PCL byl spřádán s 20 cm drátovou elektrodou pod napětím 55 kV. Vzdálenost mezi elektrodou s vysokým napětím a zemněnou elektrodou bylo nastaveno na 100 mm. Elektroda s vysokým napětím rotovala rychlostí 5 ot/min a sběrač tkanin se pohyboval rychlostí 12 mm/min. Výsledné nanovláknenné polymerní fólie byly kompaktní, ohebné a homogenní s tloušťkou 30–40  $\mu\text{m}$ . Vzorky byly nařezány na kousky 5 x 5 cm<sup>2</sup> a modifikovány plazmovým polymerem nebo antibakteriální látkou, jak je popsáno níže.



### 3.3 Depozice antibakteriální vrstvy

Pro depozici antibakteriální vrstvy byla zvolena metoda magnetronového naprašování. Substrát (nanovláknenná PCL membrána) byl umístěn do Magnetronu BESTEC, kde bylo zajištěno vakuum. Uvnitř magnetronu bylo přítomno 8 terčů, z nichž vždy pouze jeden byl otevřen. Pro naprašování nanovláken byl používán terč z Cu. Po umístění vzorku dovnitř komory magnetronu byl dovnitř vpouštěn Ar (průtok 30 sccm), nastaveny depoziční podmínky zmíněné v Tabulce 1, a proběhla depozice Cu na nanovláknenné membráně. Po uplynutí 1000 s byly nanovláknenné PCL membrány s nadeponovanou antibakteriální vrstvou mědi z magnetronu vyjmuty, a bylo s nimi dále pracováno.

*Tabulka 1: Přehled depozičních podmínek při magnetronovém naprašování. ( $\varphi$  rotace substrátu,  $P$  výkon,  $p$  tlak v komoře,  $Q_{Ar}$  průtok inertního plynu argonu,  $t$  depoziční čas).*

$P$ (W)	$p$ (Pa)	$Q_{Ar}$ (sccm)	$t$ (s)	$\varphi$ (ot/min)
41	0,15	30	1000	10

### 3.4 Depozice aminových vrstev

Jako substrát pro depozici aminových vrstev se využíval oboustranně leštěný křemík (vlastnosti jsou uvedeny v kapitole 3.1), PCL nanovláknna nebo polystyrenové kultivační misky (TPP). Jednotlivé substráty byly modifikovány v plazmovém reaktoru, ve kterém probíhala depozice tenkých vrstev plazmového polymeru z par CPA. Plazmový reaktor uvnitř obsahuje dvě elektrody. Spodní elektroda má v průměru 420 mm a je kapacitně vázaná k radiofrekvenčnímu generátoru, který pracuje na frekvenci 13,56 MHz. Vrchní elektroda, v průměru 380 mm, má tvar sprchové hlavice a na spodní straně má symetricky rozmístěny válcové otvory sloužící pro přívod plynu. Horní elektroda je zemněná a vzdálenost mezi oběma elektrodami činí 55 mm. Plazmový reaktor je čerpán turbomolekulární vývěvou spolu s rotační vývěvou až na tlak  $10^{-4}$  Pa. Depozice byla prováděna pouze za chodu rotační vývěvy. Těsnost aparatury a také desorpce na stěnách byla menší než 0,4 sccm po všechny experimenty.

Substráty byly položeny na spodní elektrodu, kde proběhla jejich předúprava pomocí argonového plazmatu po dobu 5 min. Radiofrekvenční výkon byl nastaven na 100 W, střída na 33 % a pulzní frekvence na 500 Hz. Následovala depozice plazmového aminového polymeru. Byl připraven ze směsi Ar a CPA, kde průtok argonu byl nastaven na 28 sccm pomocí řídicí jednotky průtokoměrů a průtok CPA byl nastaven na 2 sccm pomocí jehlového ventilu. Výkon radiofrekvenčního generátoru byl nastaven na 100 W, střída na 33 % a pulzní frekvence na 500 Hz. Během depozice se pracovalo za tlaku 50 Pa a celkový depoziční čas byl stanoven na 60 min k dosažení tloušťky vrstvy přibližně 250 nm na rovném substrátu. Po ukončení depozice obsahoval substrát na svém povrchu funkční skupiny  $NH_x$ , proto bylo možné substrát dále modifikovat kolagenem k zajištění lepších podmínek pro přichycení buněk na povrchu.

Pro všechny níže zmíněné experimenty byly vzorky vždy minimálně v jednom případě podrobeny depozici plazmového polymeru. Depozice PP nebyla provedena pouze v kapitolách 4.4 a 4.6. Podmínky zmíněné v Tabulce 2 byly využívány pro všechny vzorky, které mají v názvu PP (viz níže). Vlastnosti nadeponovaného PP byly tedy u všech vzorků stejné.

*Tabulka 2: Přehled klasických depozičních podmínek používaných pro depozici plazmového polymeru na vzorky.*

$Q_{CPA}$ (sccm)	$Q_{Ar}$ (sccm)	$P$ (W)	$DC$ (%)	$f$ (Hz)	$t$ (min)	$p$ (Pa)
2	28	100	33	500	60	50

### 3.5 Imobilizace kolagenu

Pro imobilizaci kolagenu na substrát byl vybrán kolagen typu I z telecí kůže od firmy SigmaAldrich s.r.o. Byl připraven roztok kolagenu rozpuštěním kolagenu v kyselině octové (0,1 M) a fosfátovém pufru (PBS). Celková koncentrace roztoku činila 0,813 mg/ml. Substrát, na který jsme chtěli imobilizovat kolagen, byl ponořen do roztoku kolagenu a ponechal se reagovat při teplotě 10 °C po dobu 16 hodin. Následně byl substrát opláchnut destilovanou vodou a nechal se sušit při pokojové teplotě. Takový substrát s imobilizovaným kolagenem byl podroben analýze na SEM a XPS, a hlavně byl využíván na sledování adheze a proliferace buněk.

### 3.6 Charakterizace připravených materiálů

Ke zjištění hmotnosti nadeponované vrstvy byly využity křemenné mikrováhy (QCM). Křemenné mikrováhy kmitají na stálé rezonanční frekvenci. Pokud se na ně nadeponuje PP nebo imobilizuje kolagen, dojde ke změně rezonanční frekvence a na základě změny rezonanční frekvence pomocí následujícího vzorce (10) jsme schopni vypočítat hmotnost nadeponované vrstvy nebo hmotnost imobilizovaného kolagenu.

$$\Delta f = - \frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \Delta m \quad (10)$$

Veličiny v tomto vzorci značí změnu rezonanční frekvence ( $\Delta f$ ),  $f_0$  je počáteční rezonanční frekvence,  $A$  zastupuje piezoelektricky aktivní oblast (na povrchu elektrod). Dále  $\rho_q$  je hustota křemene, která je tabelována na 2,648 g·cm<sup>-3</sup>,  $\Delta m$  je změna hmotnosti a  $\mu_q$  je modul pružnosti v tahu křemene. Modul pružnosti se rozlišuje pro AT a BT řezy. Pro AT řez, který byl používán v této práci, je hodnota tabelovaná na 2,89·10<sup>14</sup> dyn·cm<sup>-2</sup>. [91]

V práci byla hojně využívána rentgenová fotoelektronová spektroskopie, konkrétně Axis Supra (Kratos Analytical). Analyzované vzorky byly podrobeny nejprve analýze tzv. wide spektra při průchozí energii 80 eV, a poté byly pořízeny tzv. high resolution spektra pro jednotlivé prvky přítomné na povrchu vzorku, při průchozí energii 20 eV. Dosažené výsledky z XPS analýzy byly zpracovány v programu CasaXPS, a z pořízených high resolution spekter bylo spočítáno procentuální složení jednotlivých prvků, přítomných na povrchu vzorku.

Kromě XPS byla hojně využívána skenovací elektronová mikroskopie. Vakuum v komoře elektronového mikroskopu SEM LYRA3 (Tescan) bylo kolem  $9 \cdot 10^{-3}$  Pa, pracovní vzdálenost pro focení vzorků byla volena na 9 mm a napětí bylo voleno na 10kV. Vzorky byly na SEM vždy před focením dostatečně zvětšeny a zaostřeny.

### 3.7 Proliferace buněk na nanovláčknech

Kultivace buněk (VSMC) probíhala na polystyrenových miskách (TPP, Švýcarsko) v inkubátoru od firmy Thermo Fisher Scientific za teploty 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> a 95 % vlhkosti. Kultivace probíhala v kultivačním mediu DMEM s přidavkem 10 % FBS, 1.2 mM L-glutaminu a 100 U/mL penicilinu/streptomycinu. Pasážování zásobních buněk se provádělo každé tři dny nebo po dosažení 80 % konfluence. Pro enzymatické uvolnění buněk od povrchu se používal Trypsin-EDTA. Po uvolnění byl trypsin zneutralizován kultivačním médiem a buňky byly aplikovány na modifikovaná nanovláknna. Nanovláknna byla nařezána na čtverce o velikosti 1 cm<sup>2</sup> a byla umístěna na CellCrown<sup>TM</sup> inzerty (Scaffdex, Sigma Aldrich) (Obr. 27). Inzerty o vnitřním průměru 12,5 mm byly s nanovláknny vloženy do 12 jamkové kultivační destičky a na nanovláknna se nanosly buňky. CellCrown<sup>TM</sup> inzerty byly ke konci experimentů zaměněny za skleněné válečky o stejném průměru z důvodu pronikání buněk mezi otvory CellCrown<sup>TM</sup> (popsáno níže). Do každé jamky bylo aplikováno 30 000 buněk  $\pm$  10 000 buněk v objemu 1 ml. Množství buněk se lišilo podle experimentu (popsáno níže).



Obr. 27: CellCrown<sup>TM</sup> inzerty od firmy Sigma Aldrich s.r.o. používané při sledování proliferace buněk na modifikovaných PCL nanovláčknech

### 3.7.1 ATP test

Buňky proliferovaly na nanovlákněch po dobu 2 dnů a poté byly výsledky vyhodnoceny pomocí proliferačního testu na stanovení relativního množství ATP. Jedná se o test, který je založen na měření chemiluminiscence zprostředkované ATP z lyzátu buněk. Nanovlákně s buňkami byla promyta PBS a následně bylo přidáno 200  $\mu$ l lyzačního pufru Somatic cell ATP releasing reagent (Sigma Aldrich). Celá směs se inkubovala na třepačce po dobu 10 min za vzniku lyzátu. Poté bylo odebráno 20  $\mu$ l lyzátu, který byl smíchán s 20  $\mu$ l roztoku ATP mix, jehož obsahem je směs luciferázy s luciferinem. ATP přítomné v lyzátu umožňuje luciferáze štěpit luciferin, který pak emituje chemiluminiscenci. Měření množství buněk byla prováděna v duplikátech a měřena na luminometru Hidex Sense Microplate Reader (Hidex, Turku, Finland) pomocí programu Hidex. Podle intenzity luminiscence bylo možné odvodit, jak moc buňky proliferují na modifikovaném povrchu nanovlákně.

### 3.7.2 Resazurinové barvení

Jednalo se o další vyhodnocovací metodu na stanovení proliferace buněk na modifikovaném povrchu. Principem byla metabolizace, tedy redukce nefluorescenčního modrého resazurinu na fluorescenční červený resorufin. Pracovalo se při zhasnutém světle, protože resazurin je citlivý na světlo. Podle množství vzorků byl připraven roztok resazurinu s médiem DMEM+10 % FBS bez fenolové červeně. Výsledná koncentrace tedy byla 40 nM. Ke všem vzorkům byl přidán nahřátý roztok media s resazurinem, a vzorky byly inkubovány 2-4 hodiny při 37 °C. V průběhu inkubace se měnila modrá barva resazurinu na růžovou. Po uplynutí inkubace se pipetovalo 150  $\mu$ l do destičky, která byla umístěna do luminometru Hidex Sense Microplate Reader a byla měřena fluorescence, kde excitace byla při cca. 530-570 nm a emise při 580-620 nm. Při vyhodnocení výsledků se musel odečíst blank, tedy materiál bez buněk inkubovaný s roztokem resazurinu. Výhodou této metody je, že buňky lze promýt PBS dát jim nové médium a lze pokračovat v kultivaci nebo v jiných metodách detekce.

### 3.7.3 Počítání buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu

Jedná se o zobrazovací vyhodnocovací techniku. Hoechst se používá ke specifickému barvení jader živých nebo fixovaných buněk a tkání. Běžně se používá k rozlišení kompaktního chromatinu apoptických jader, identifikaci replikujících buněk a k třídění buněk na základě jejich obsahu DNA. Podle množství vzorků bylo namícháno potřebné množství pracovního roztoku, kde Hoechst (0,1  $\mu$ g/ml) byl smíchán v poměru 1:10 000 v roztoku s 0,1 M NaCl, 10 mM EDTA a 10 mM Tris pH 7. Pracovní roztok (1,5 ml) byl nanesen na modifikovaný povrch (misky, nanovlákně), a byl inkubován po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí doby byly vzorky vyhodnoceny na fluorescenčním mikroskopu pomocí pořízení fotografií. Fotografie byly pořizovány od kraje misky k druhému kraji, a následně počet přichycených buněk k podkladu byl vyhodnocen pomocí programu Fiji-ImageJ na počítání buněk (viz [92]).

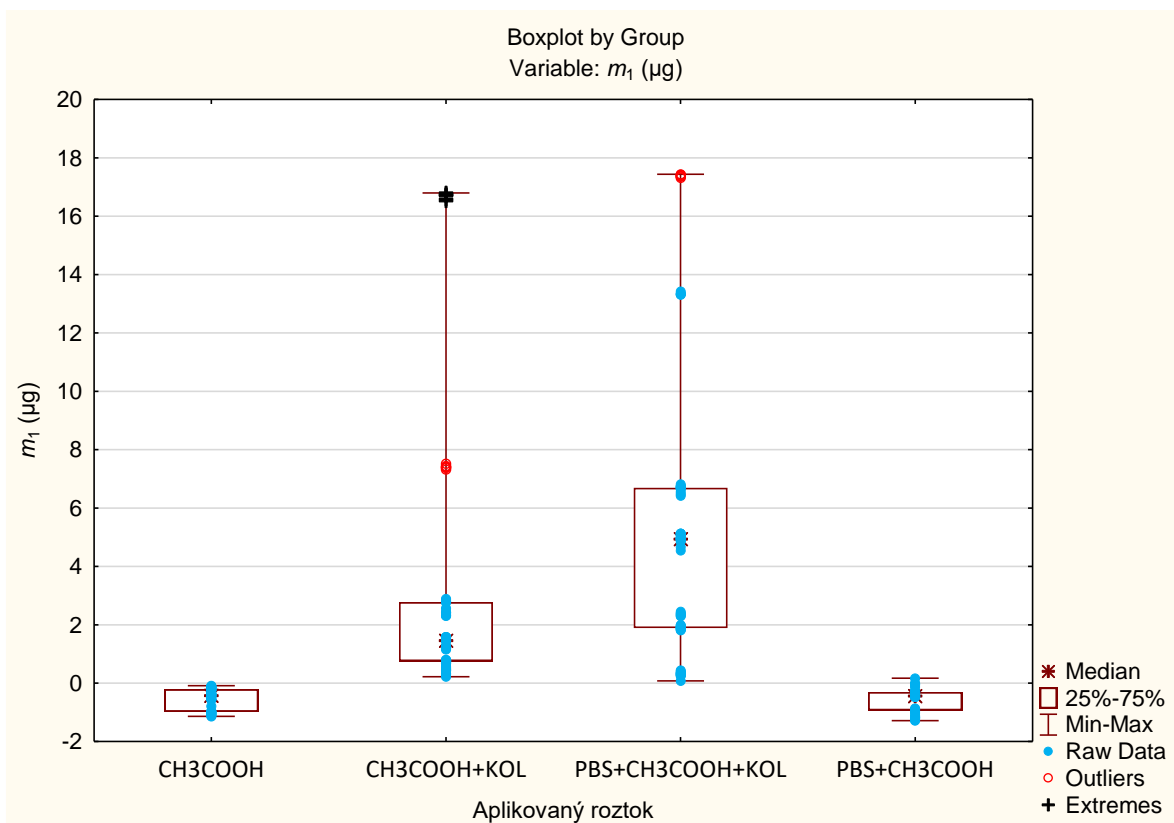
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Volba vhodného roztoku kolagenu pro jeho imobilizaci na povrchu

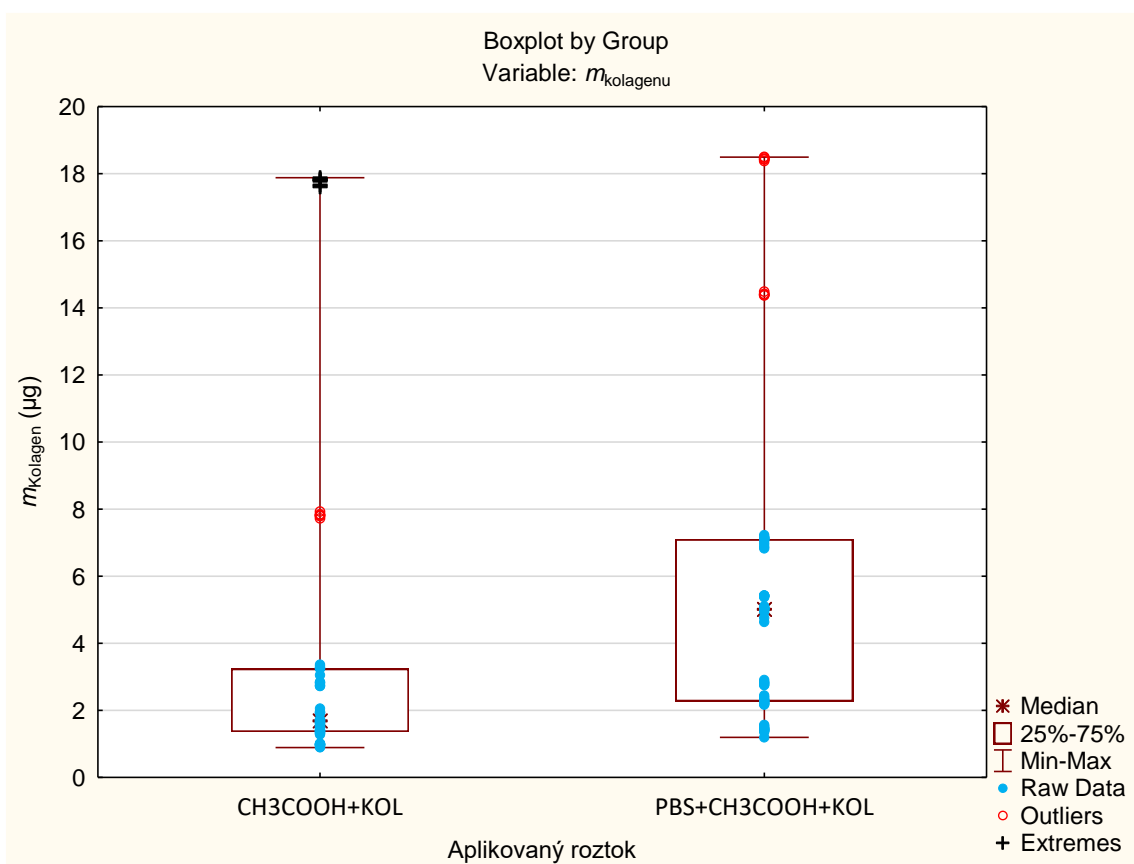
Pro imobilizaci kolagenu na povrchu aminového plazmového polymeru byly vybrány dva roztoky kolagenu, a to kolagen (KOL) rozpuštěný v kyselině octové ( $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{KOL}$ ) a roztok  $\text{PBS} + \text{CH}_3\text{COOH} + \text{KOL}$ , tedy kolagen rozpuštěný v kyselině octové a fosfátovém pufru (PBS). Tyto roztoky byly nanášeny na vrstvy těsně po jejich depozici. Pro kontrolu rozpustnosti vrstvy plazmového polymeru byly na třetí vzorek nanášeny i roztoky bez kolagenu – kyselina octová a na další vzorek  $\text{PBS} + \text{CH}_3\text{COOH}$ . Provedli jsme tři sady depozic, kde byl přehled depozičních podmínek uveden do Tabulky 2. U druhé sady depozic jsme však zvolili depoziční čas 35 minut namísto klasických 60 minut, z důvodu nedostatku CPA pro depozici. Množství imobilizovaného kolagenu a hmotnost nadeponované vrstvy plazmového polymeru jsme zjišťovali pomocí křemenných mikrovah (viz [93]). Jako substráty jsme tedy v každé sadě vložili do aparatury několik křemenných mikrovah (viz kapitola 3.6), aby bylo pro experimenty s roztoky k dispozici několik stejných vrstev.

Pomocí křemenných mikrovah jsme zjistili hmotnost nadeponované vrstvy ( $m_{\text{CPA}}$ ) a hmotnost imobilizovaného kolagenu ( $m_1$ ). V průběhu imobilizace kolagenu však bylo zjištěno, že roztoky  $\text{PBS} + \text{CH}_3\text{COOH}$  a  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , ve kterých byl rozpuštěn kolagen, částečně rozpouští vrstvu plazmového polymeru. To falešně snižuje hmotnost imobilizovaného kolagenu, proto byla zavedena nová veličina  $m_{\text{kolagen}}$ , která rozpustnost vrstvy PP započítává. Na jednom vzorku byla  $m_1$  naměřena na 0,3  $\mu\text{g}$ , pokud jsme však započítali rozpustnost vrstvy,  $m_{\text{kolagen}}$  čítala na tom samém vzorku 1,4  $\mu\text{g}$ .

Z uvedených dat (Obr. 28 a Obr. 29) lze tvrdit, že roztoky částečně rozpouští vrstvu plazmového polymeru z CPA, což musí být bráno v potaz při přepočtu hmotností kolagenu. Dále lze říct, že roztoky s kolagenem se mezi sebou statisticky významně liší z hlediska nanášené vrstvy kolagenu a nejlepších výsledků imobilizace dosahoval roztok  $\text{PBS} + \text{CH}_3\text{COOH} + \text{KOL}$ . Proto se pro další experimenty jako imobilizační roztok kolagenu používal pouze roztok  $\text{PBS} + \text{CH}_3\text{COOH} + \text{KOL}$ .



Obr. 28: Hmotnost imobilizovaného kolagenu ( $m_1$ ), při působení roztoku s PBS a bez PBS a množství rozpouštění vrstvy CPA při působení kys. octové a kys. octové s PBS.



Obr. 29: Hmotnost imobilizovaného kolagenu se započítáním rozpustnosti vrstvy ( $m_{\text{kolagen}}$ ).

## 4.2 Vlastnosti modifikovaných substrátů

### 4.2.1 XPS analýza modifikovaných substrátů

Abychom zjistili chemické složení vrstvy PP, byla provedena analýza pomocí rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS). Analyzované substráty byly PCL nanovlákná, polystyrenové kultivační misky a oboustranně leštěný křemík, který jsme použili jako kontrolu pro porovnání s nanovláknem.

Nejprve byly analyzovány samotné substráty. U křemíkového substrátu se předpokládalo, že obsahuje pouze Si, proto jako jediný nebyl analyzován. PCL nanovlákná byla však podrobena detailnější analýze a bylo zjištěno, že se skládají pouze z C a O a jejich poměr O/C byl 0,27, což přibližně odpovídá složení odvozenému z chemického vzorce PCL. Kultivační misky byly také podrobeny XPS analýze a výsledek byl obdobný jako u PCL vláken, jelikož se na povrchu vyskytoval pouze O a C. Poměr O/C byl však pro kultivační misky 0,12. Kyslík na miskách byl pravděpodobně důsledkem úpravy misek od výrobce, protože v čistém polystyrenu se vyskytuje pouze uhlík.

Na neupravených substrátech PCL a kultivačních miskách byla vyzkoušena imobilizace kolagenu a následná charakterizace povrchu. V případě úspěšné imobilizace kolagenu se dal očekávat zvýšenější obsah kyslíku a dusíku než u referenčních vzorků, protože samotný protein obsahuje dusíkaté a kyslíkaté funkční skupiny. U PCL vláken byly pro imobilizaci kolagenu aplikovány roztoky  $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{PBS}+\text{KOL}$  a  $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{KOL}$ . Pro roztok  $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{PBS}+\text{KOL}$  probíhala imobilizace 16 h a pro roztok  $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{KOL}$  5 h. Pro oba roztoky však poměr O/C na vláknech zůstal stejný (0,27), což znamená, že nedošlo k žádné imobilizaci kolagenu. Pro kultivační misky imobilizace probíhala 16 h a byl zvolen pouze roztok  $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{PBS}+\text{KOL}$ . Poměr O/C byl naměřen 0,21, což je větší hodnota než 0,12 u misky bez úpravy, a zároveň byl na povrchu detekován dusík, kde poměr N/C byl 0,14. Znamená to tedy, že na kultivační misku se kolagen imobilizoval. Imobilizace kolagenu však mohla být způsobena tím, že výrobce misky upravuje, a kolagen se tedy na misku váže bez problému.

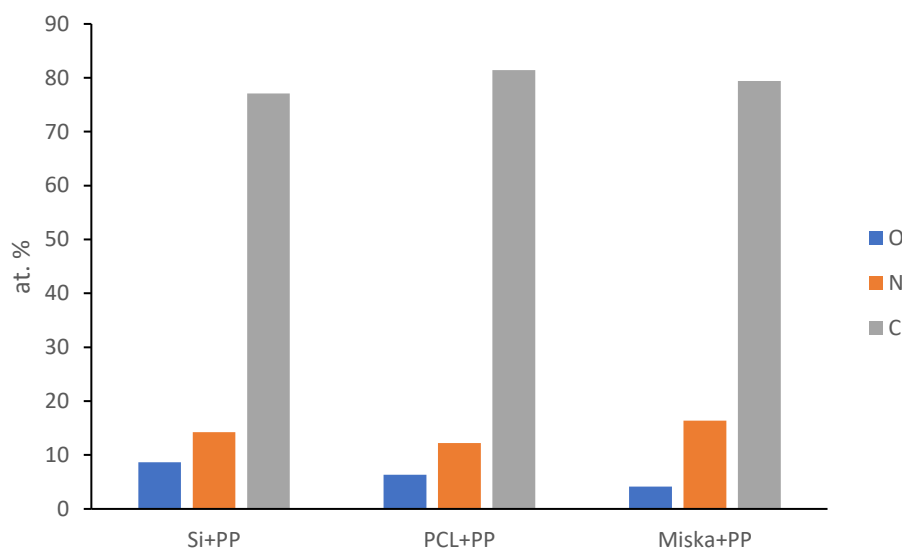
Protože se kolagen na vlákna neimobilizoval, aplikovali jsme depozici plazmového polymeru (PP) na všechny substráty a charakterizovali jsme vytvořenou vrstvou. Substráty s nadeponovanou vrstvou PP jsme opět podrobili XPS analýze a výsledná data můžeme vidět na Obr. 30. Z grafu lze vyčíst, že se PP úspěšně nadeponoval na všechny substráty, protože byl detekován N.

Pro detailnější přehled jsme porízená data zobrazili do poměru N/C (Obr. 31) a poměru O/C (Obr. 32). Tyto dva grafy znázorňují složení substrátu s nadeponovanou vrstvou PP a jak se toto složení mění v závislosti na aplikovaném roztoku, který se používá pro imobilizaci kolagenu. Pro roztok  $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{PBS}+\text{KOL}$  vidíme na Obr. 31 u Si a PCL nanovláken nárůst poměru N/C, což potvrzuje úspěšnou imobilizaci kolagenu. Tento nárůst je po aplikaci roztoku  $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{PBS}+\text{KOL}$  pozorován také u poměru O/C (Obr. 32) na všech substrátech. Srovnáme-li  $\text{PP}+\text{CH}_3\text{COOH}+\text{PBS}+\text{KOL}$  a  $\text{PP}+\text{CH}_3\text{COOH}+\text{PBS}$  (Obr. 32), tak jasně vidíme, že tento nárůst nelze vysvětlit pouze oxidací vrstvy vlivem roztoku, ale muselo dojít k úspěšné imobilizaci kolagenu. Hodnoty pro misku s aplikovaným roztokem  $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{KOL}$  nebyly změřeny z důvodu ušetření materiálu, protože bylo již dříve potvrzeno, že nejlepší imobilizační

vlastnosti vykazuje roztok  $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{PBS}+\text{KOL}$ , a tedy bylo pracováno pouze s ním. Na Obr. 31 bylo také potvrzeno rozpouštění vrstvy PP při působení roztoku  $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{PBS}$ , což se projevilo úbytkem poměru N/C.

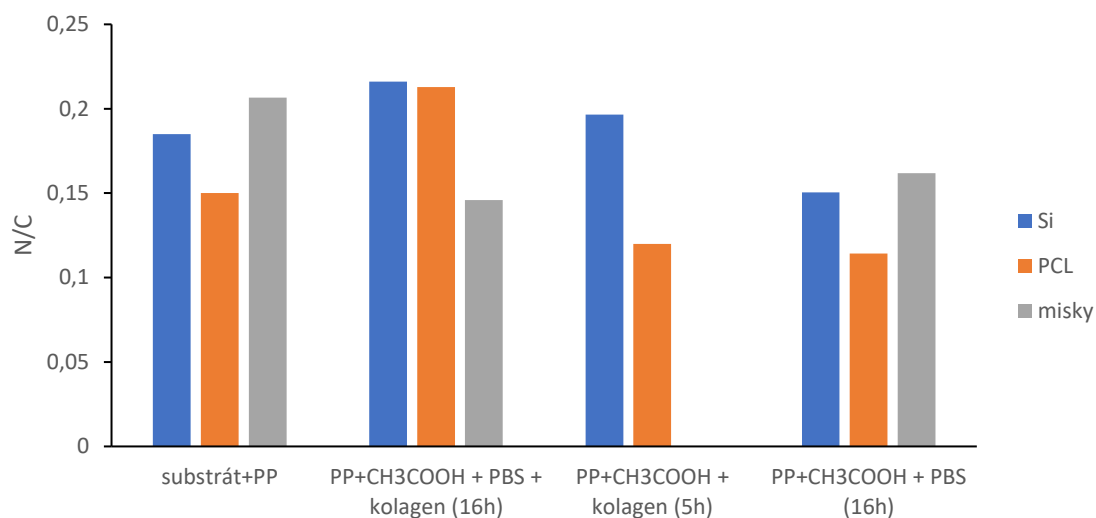
Funkční skupiny na substrátu Si (Obr. 33) a PCL nanovlákních (Obr. 34) jsou stejné. Liší se však v zastoupení v závislosti na aplikovaném roztoku. Pro roztok  $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{PBS}+\text{KOL}$  je vidět na obou substrátech zvýšený výskyt COOR, což může být potvrzení úspěšné imobilizace kolagenu, protože kolagen ve své struktuře tyto skupiny obsahuje.

Srovnání všech typů substrátů po aplikaci roztoků pro imobilizaci kolagenu je zobrazeno na Obr. 35. Jsou zde také znázorněny odlišnosti v rámci délky působení jednotlivých roztoků a jak moc dané roztoky rozpouští vrstvu PP. Pro všechny substráty byl nejvhodnějším roztokem pro imobilizaci roztok  $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{PBS}+\text{KOL}$ , což je znázorněno zvýšeným obsahem N a O. U kultivačních misek byl pozorován výskyt stopového množství Cl, což bylo pravděpodobně způsobeno nedostatečným opláchnutím, protože chlor se používá pro přípravu PBS ve formě KCl a NaCl.

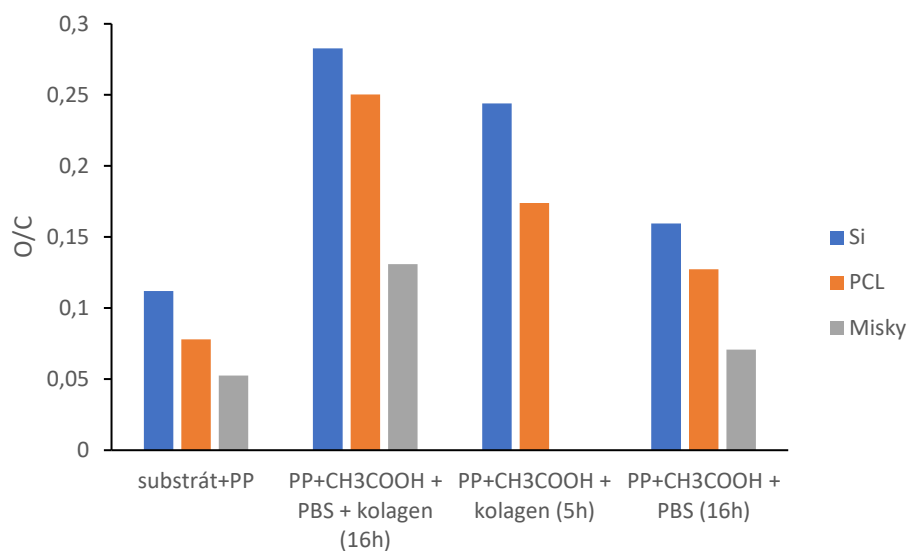


Obr. 30: XPS analýza substrátů Si, PCL vláken a kultivačních misek s nadeponovanou vrstvou plazmového polymeru.

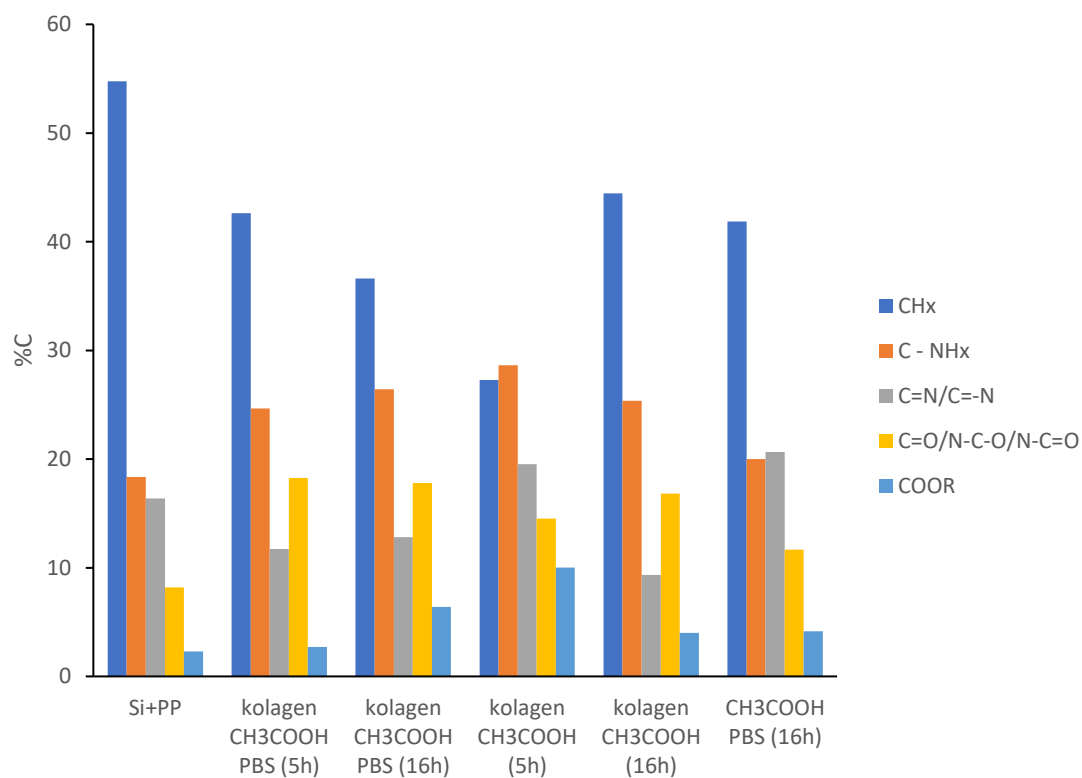




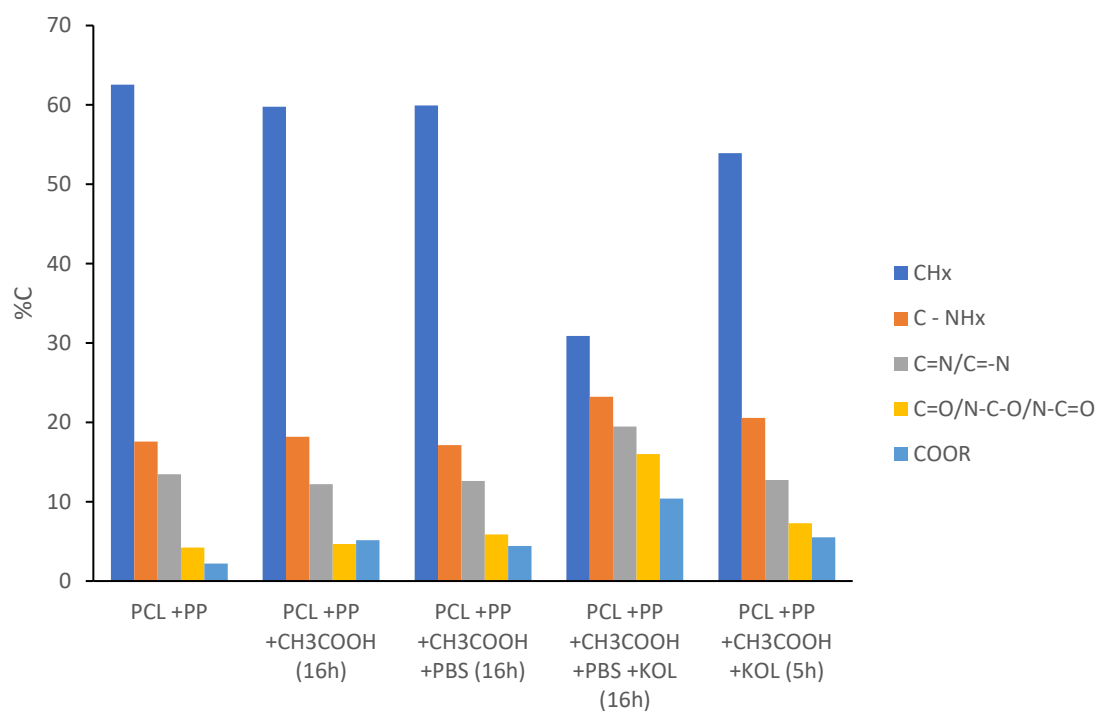
Obr. 31: XPS analýza substrátů Si, PCL vláken a kultivačních misek s nadeponovanou vrstvou plazmového polymeru. Znázornění poměru N/C a znázornění odlišností ve složení vrstvy při aplikaci roztoků využívajících se k imobilizaci kolagenu.



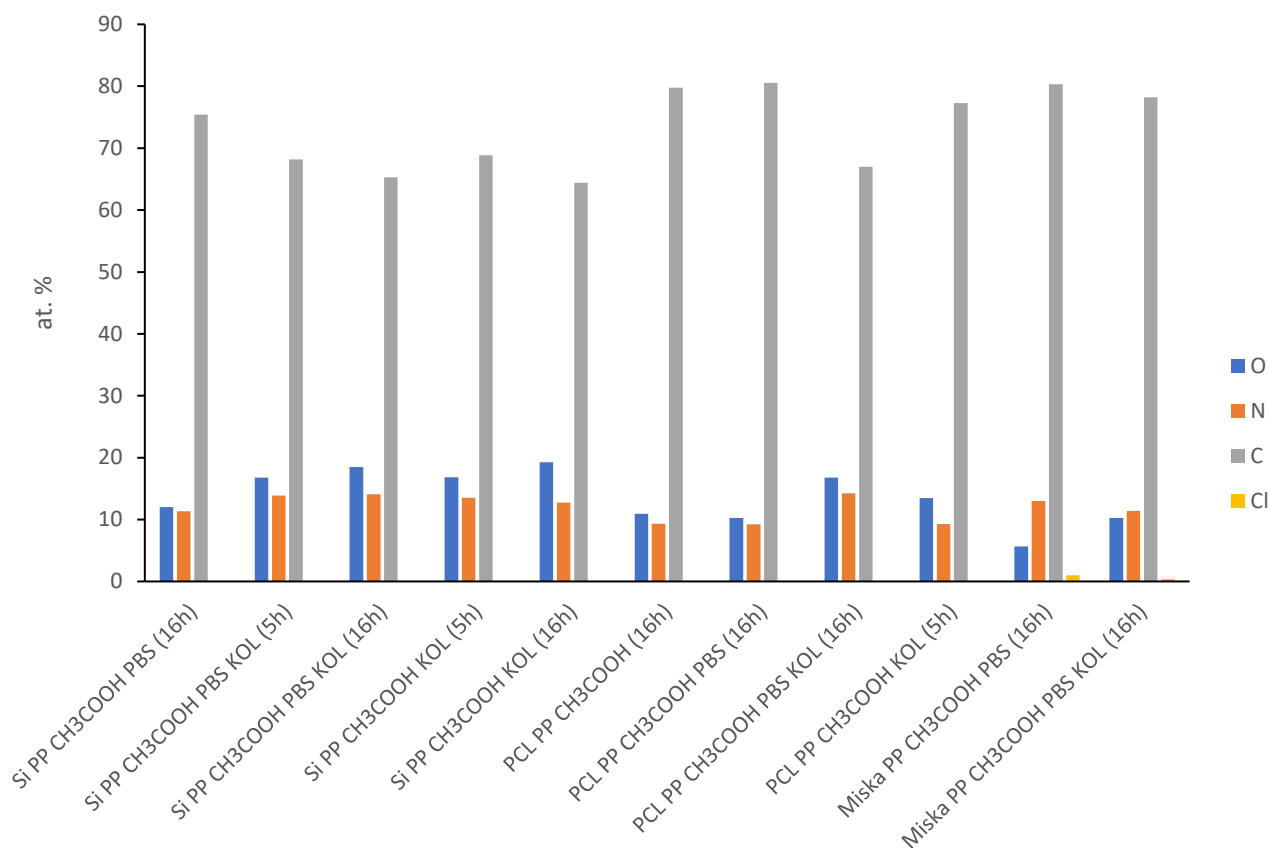
Obr. 32: XPS analýza substrátů Si, PCL vláken a kultivačních misek s nadeponovanou vrstvou plazmového polymeru. Znázornění poměru O/C a znázornění odlišností ve složení vrstvy při aplikaci roztoků využívajících se k imobilizaci kolagenu.



Obr. 33: Zastoupení funkčních skupin vzhledem k procentuálnímu složení uhlíku obsaženém na povrchu substrátu Si (viz Obr. 30). Na Si byl nadeponován plazmový polymer. Pro roztok  $\text{CH}_3\text{COOH}$  nejsou uvedena data, protože vrstva PP kompletně delaminovala.



Obr. 34: Zastoupení funkčních skupin vzhledem k procentuálnímu složení uhlíku obsaženém na povrchu substrátu PCL nanovláken (viz Obr. 30). Na PCL nanovlákně byl nadeponován plazmový polymer.



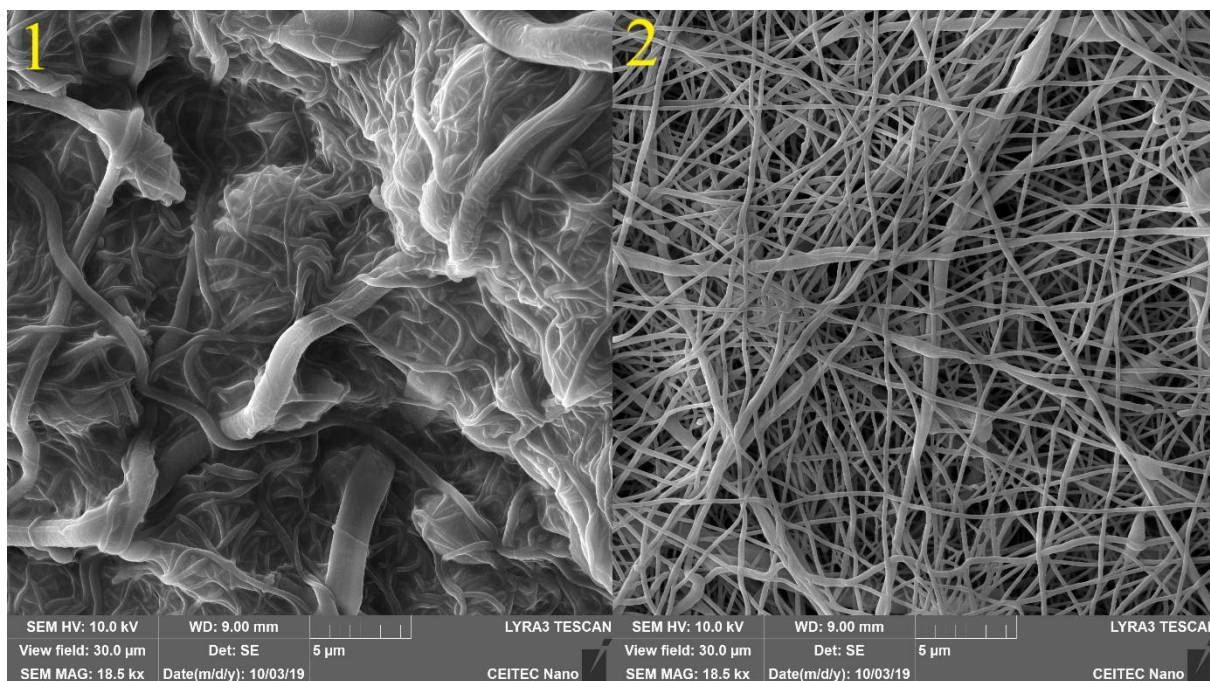
Obr. 35: XPS analýza substrátů Si, PCL nanovláken a kultivačních misek s nadeponovanou vrstvou PP. Graf znázorňuje odlišnosti ve složení vrstvy v závislosti na aplikovaném roztoku, který se využívá na imobilizaci kolagenu. Je zde znázorněno i rozpouštění vrstvy PP.

#### 4.2.2 SEM analýza PCL nanovláken

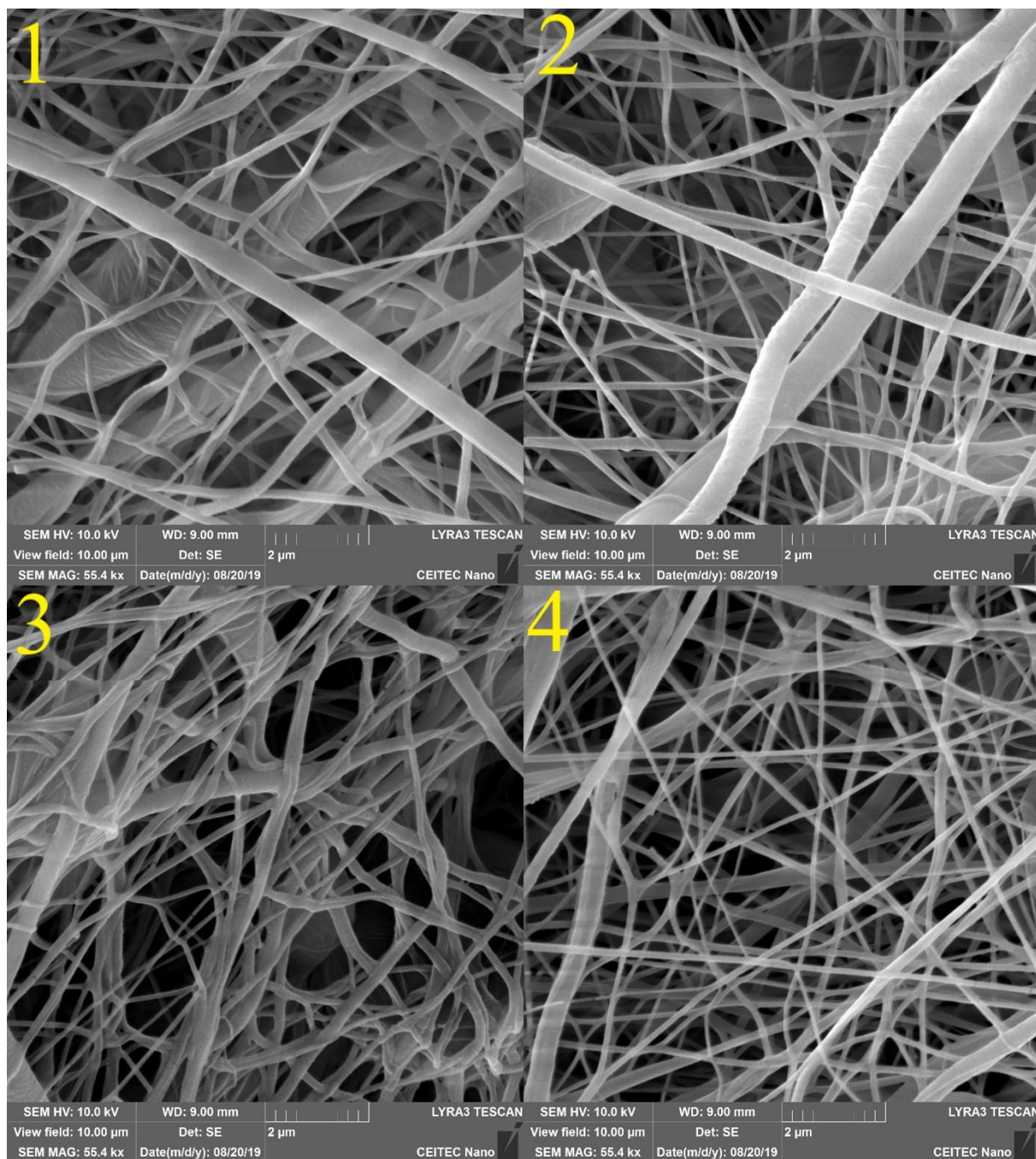
Pro vizuální zobrazení modifikovaných vláken a také k určení tloušťky vláken byla vlákna zobrazena SEM. Pozorovalo se, jestli kolagenová vlákna skutečně ulpívají na povrchu PCL nanovláken. Bylo zjištěno, že kolagen se na nanovlákná přichycuje, což můžeme pozorovat např. v Tabulce 3, kde vidíme rostoucí trend tloušťky nanovláken. Z Obr. 36 můžeme vidět jednoznačné přichycení kolagenu na nanovlákních s nadeponovanou vrstvou PP. Prokázali jsme tedy, že PP imobilizuje kolagen. Dále na Obr. 37 jsou znázorněna PCL vlákna bez vrstvy plazmového polymeru a na Obr. 38 jsou pak znázorněna vlákna s nadeponovanou vrstvou PP, kde také můžeme vidět imobilizovaný kolagen. Z těchto obrázků bylo jednoznačně potvrzeno, že se kolagen váže na PCL nanovlákná s nadeponovanou vrstvou plazmového polymeru, a je tak možné tato vlákna použít v tkáňovém inženýrství. Abychom mohli jednoznačně potvrdit toto tvrzení, bylo potřeba prozkoumat adhezi buněk na takto modifikovaných površích.

Tabulka 3: Průměr tloušťky všech nanovláken zobrazenými pomocí SEM

série PCL nanovlákná		bez úpravy	PCL+PP	PCL+PP+kolagen
214	tloušťka vlákna (nm)	110±40	210±20	270±80
218	tloušťka vlákna (nm)	130±40	140±50	200±50

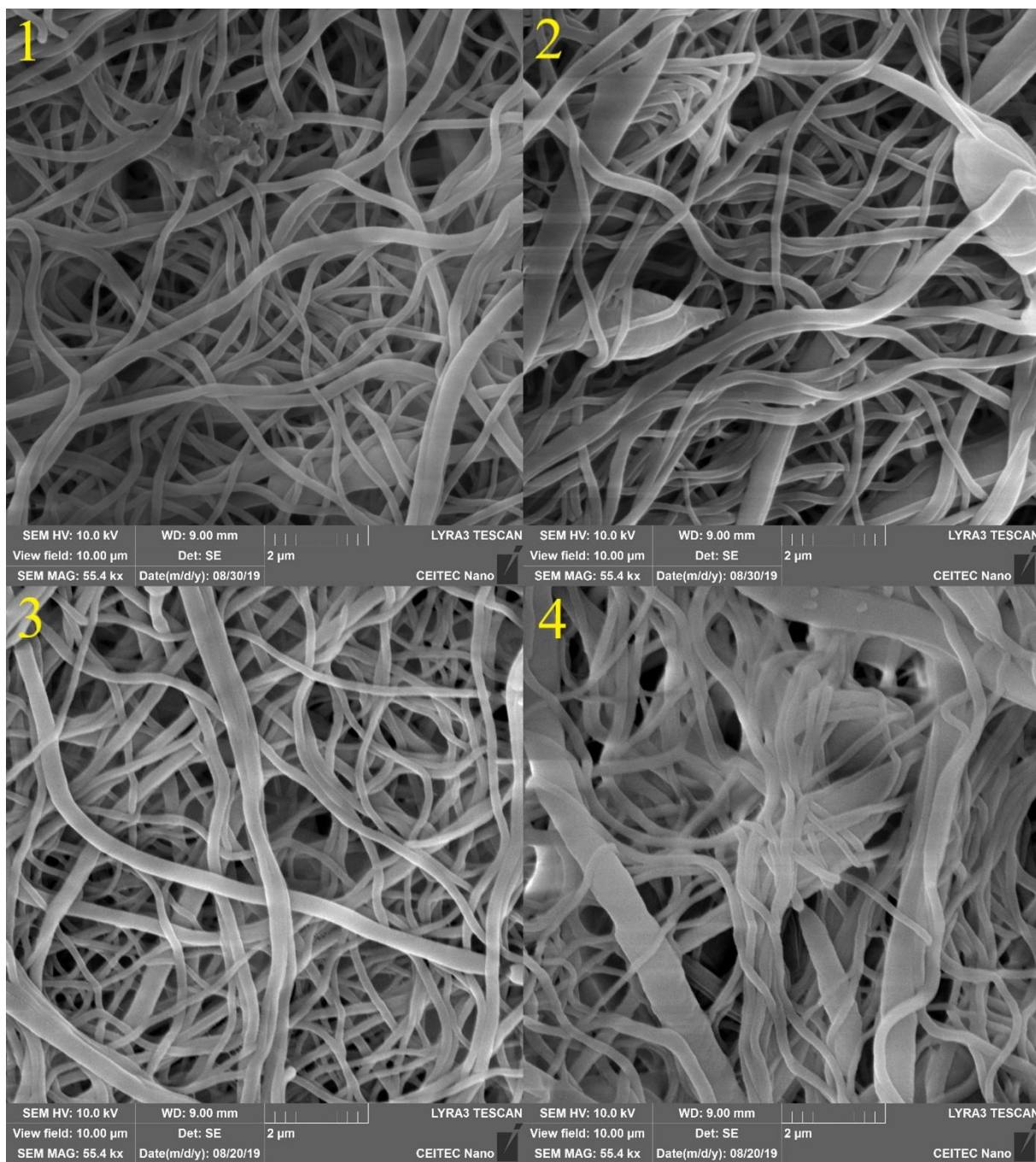


*Obr. 36: PCL nanovlákna znázorněná pomocí SEM. (1 – PCL vlákna s imobilizovaným kolagenem na nadeponované vrstvě plazmového polymeru, pro imobilizaci kolagenu byl použit roztok PBS+CH<sub>3</sub>COOH; 2 – PCL nanovlákna s nadeponovanou vrstvou PP.)*



Obr. 37: PCL nanovlákná, která nebyla modifikovaná plazmovým aminovým polymerem. (1 – PCL +  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 2 – PCL + PBS +  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 3 – PCL +  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + kolagen, 4 – PCL +  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + PBS + kolagen)

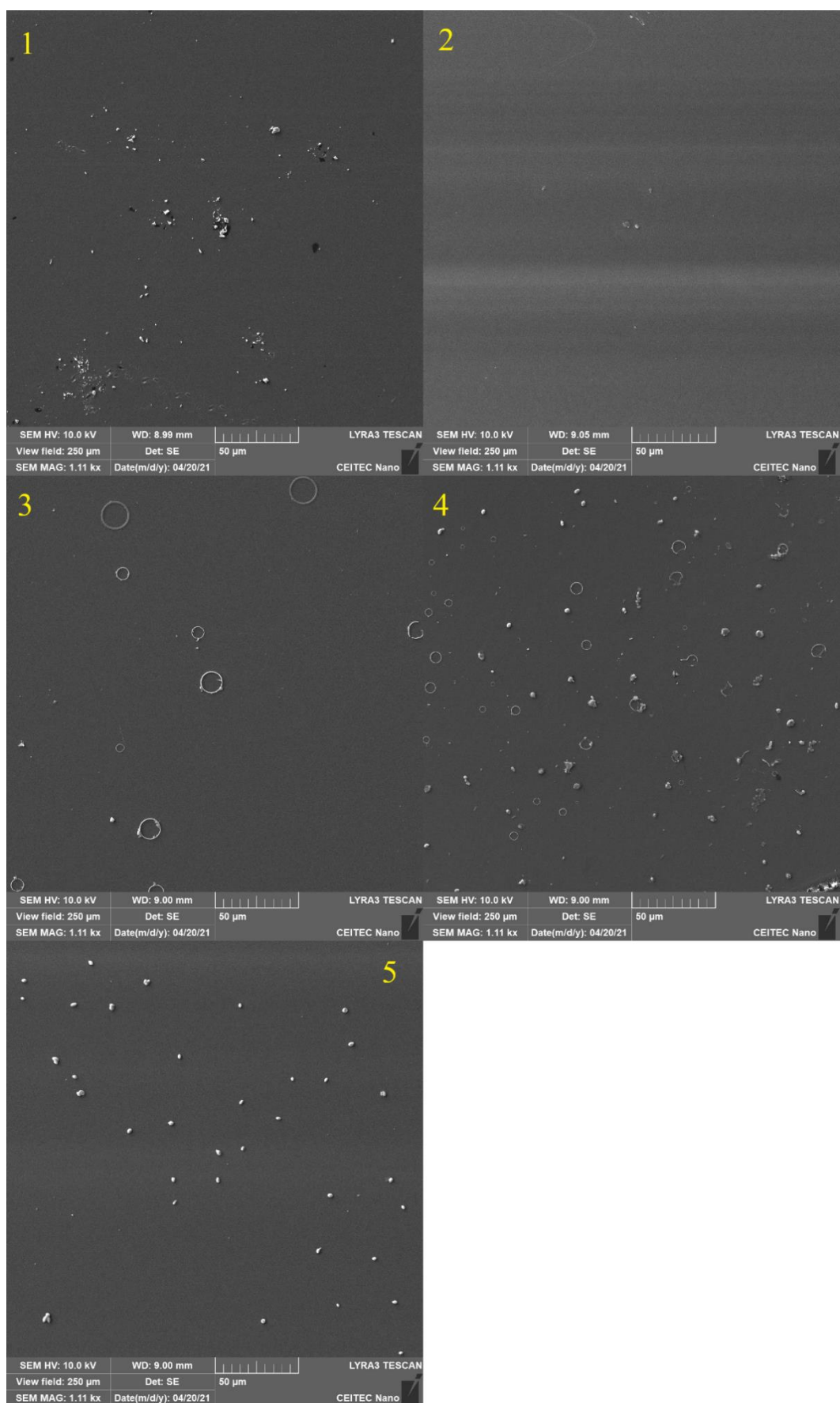




Obr. 38: PCL nanovlákna s nadeponovanou vrstvou plazmového polymeru. (1 – PCL + PP +  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 2 – PCL + PP + PBS +  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 3 – PCL + PP +  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + kolagen, 4 – PCL + PP +  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + PBS + kolagen)

### 4.2.3 SEM analýza kultivačních misek

Pro kultivaci buněk byly v práci používány také kultivační misky, které byly upravené stejným způsobem jako PCL nanovlákná. Modifikované misky byly umístěny do SEM a byly pozorovány strukturní odlišnosti mezi jednotlivými miskami. Z přiloženého obrázku (Obr. 39) byly vyvozeny následující závěry. Miska, která byla modifikovaná plazmovým polymerem po reakci s roztokem PBS+CH<sub>3</sub>COOH (fotka s označením 3), obsahuje na svém povrchu kruhy. Jelikož miska upravená pouze PP (fotka 2) neobsahuje na povrchu žádné nerovnosti a přebytečné částice, můžeme z toho vyvodit, že kruhy způsobené na fotce 3 jsou právě důsledkem rozpuštění vrstvy PP. Můžeme tedy konstatovat, že roztok PBS+CH<sub>3</sub>COOH rozpouští vrstvu PP, což jsme potvrdili již dříve v kap. 4.1. Nyní však byl pozorován další fakt, a to že na misce s kolagenem (fotka 5) se kolagen vyskytoval pouze ve formě kuliček, a ne vláken. Také bylo pozorováno, že se kuličky kolagenu na misce s PP (fotka 4) nevyskytují uvnitř kruhů, které byly způsobeny rozpustností vrstvy působením roztoku PBS+CH<sub>3</sub>COOH. Z toho můžeme vyvodit, že kolagen měl menší prostor na navázání na povrch misky. Můžeme namítnout, že na základě této teorie by se v tom případě na fotce 5 neměl vyskytovat žádný kolagen, ale miska samotná je již od výrobce modifikovaná pro lepší adhezi buněk. Modifikaci misky jsme potvrdili v kapitole 4.2.1 z XPS analýzy, kde na kontrolní misce byl přítomen O. Je tedy pravděpodobné, že působící roztok PBS+CH<sub>3</sub>COOH mohl rozpustit i modifikaci od výrobce a uvnitř kruhu je jen samotný polystyren, a tudíž se zde nic nenaváže. Nicméně tento poznatek byl zjištěn až ke konci experimentů, proto byl pro imobilizaci kolagenu na nanovláknách a následné sledování proliferace buněk vybrán právě roztok PBS+CH<sub>3</sub>COOH+KOL.



Obr. 39: SEM analýza modifikovaných misek. 1–miska bez úpravy (K), 2–miska s PP (CPA), 3–miska s PP a PBS+CH<sub>3</sub>COOH (ROZ), 4–miska s PP a PBS+CH<sub>3</sub>COOH+kolagenem (CPA+KOL), 5–miska s kolagenem (KOL).

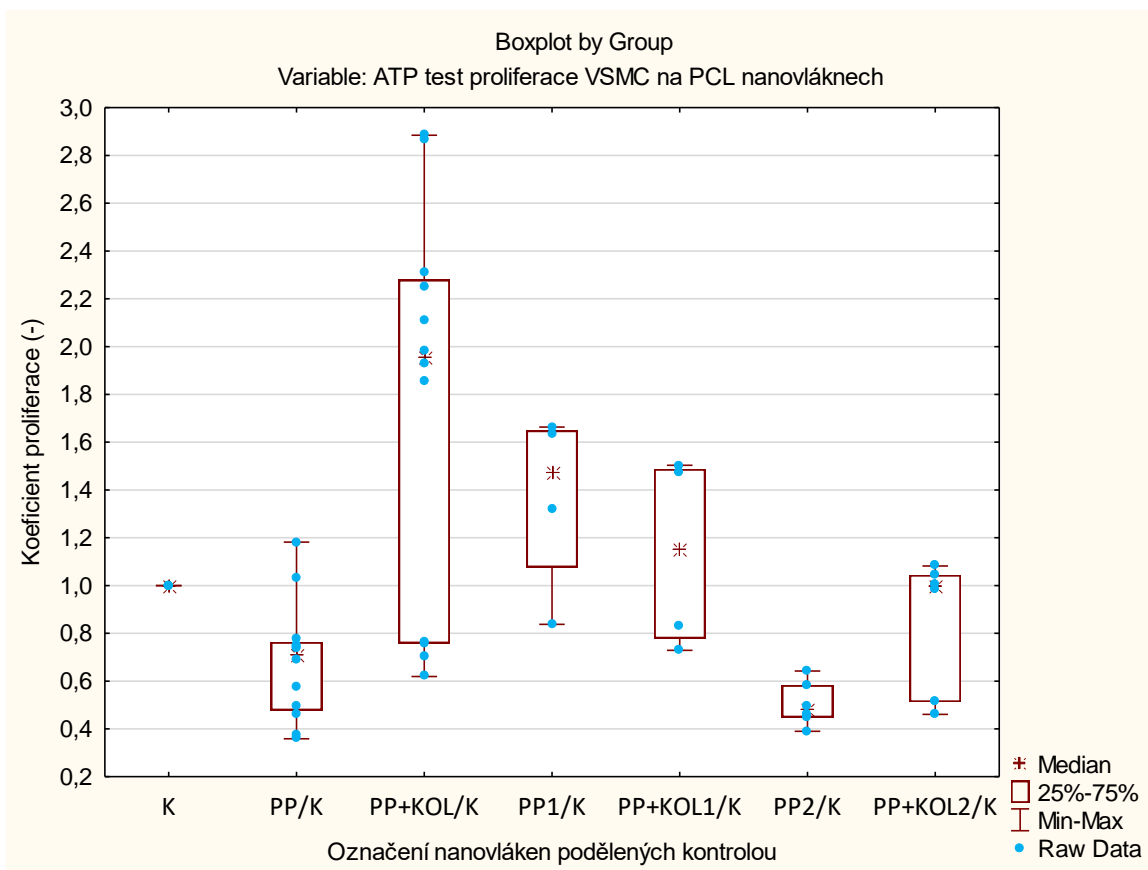


### 4.3 Kultivace VSMC na modifikovaných PCL nanovlákních

Abychom mohli použít modifikovaná nanovlákní v tkáňovém inženýrství, bylo potřeba ověřit, že na nanovlákních se buňkám daří, a tedy proliferují ve velkém množství. Pro analýzu byly vybrány buňky hladkého svalstva VSMC a jako vyhodnocovací test byl zvolen ATP proliferační test na sledování množství ATP uvolněného lyzací buněk. Proliferaci buněk jsme sledovali na třech typech vláken, a to na PCL vláknech bez modifikace, na PCL vláknech s nadeponovanou vrstvou PP a PCL vláknech s imobilizovaným kolagenem na nadeponované vrstvě PP. Pro depozici PP byly voleny vždy stejné depoziční podmínky (viz Tabulka 2) a imobilizace kolagenu byla prováděna po dobu 16 h. Jako imobilizační roztok byl vždy používán roztok PBS+CH<sub>3</sub>COOH+KOL. Každý typ nanovláken byl přichycen ke korunkám CellCrown™ (viz Obr. 27) a byly na něj aplikovány VSMC buňky.

Na modifikovaných nanovlákních byl proveden ATP test celkově čtyřikrát. Ve všech případech byly na nanovlákní aplikovány VSMC buňky a byly vysety po 50 000 (kromě v pořadí třetího testu, kde bylo vyseto pouze 30 000 buněk z důvodu nedostatečného množství buněk). Bylo také pozorováno, jestli na proliferaci buněk má vliv stáří modifikovaných nanovláken. Jako analyzovaná vlákna byla použita vlákna s označením K (PCL vlákna bez úpravy); PP, PP1, PP2 (PCL vlákna upravená plazmovým polymerem) a vlákna s označením PP+KOL, PP+KOL1 a PP+KOL2 (PCL vlákna upravená plazmovým polymerem a kolagenem). Jednotlivé typy PCL vláken se od sebe lišily stářím, kdy PCL vlákna s označením PP a PP+KOL byla stará 6 týdnů, vlákna s označením PP1 a PP+KOL1 byla stará 4 týdny a vlákna s označením PP2 a PP+KOL2 byla nově zvlákněná. Všechna nanovlákní byla vystavena stejným depozičním (Tabulka 2) i imobilizačním (kapitola 3.5) podmínkám, takže se lišila pouze ve stáří.

Všechny dílčí ATP testy byly nakonec shrnuty do Obr. 40 pro znázornění rozdílů. Uvedená data byla normalizována vůči kontrole, tedy nanovláknům bez úpravy, a byl vypočítán tzv. koeficient proliferace, který udává, v jakém množství je proliferace na modifikovaných površích lepší nebo horší oproti nemodifikovanému povrchu. Z přiloženého grafu (Obr. 40) je vidět, že i když byly zajištěny stejné podmínky, tak na stejných vláknech je vidět obrovský rozptyl naměřených hodnot a vychází v každé korunce jiná proliferace. Je zde taky pozorován trend, že čím starší nanovlákní, tím víc buněk na nanovlákních proliferuje. Jsou zde však vidět velké rozdíly i mezi stejnými modifikacemi např. mezi PP1 a PP2 nebo PP+KOL a PP+KOL2. Jelikož nebylo dosaženo stejných výsledků na stejných vláknech, došli jsme k závěru, že je možné, že buňky při vysetí mohou procházet malými mezerami mezi nanovláknem a korunkou (Obr. 27), na kterou bylo PCL vlákno uchyceno. Proto, v rámci ušetření materiálu, byly další ATP testy prováděny již výhradně na neupravených PCL nanovlákních za účelem vyřešení tohoto problému.



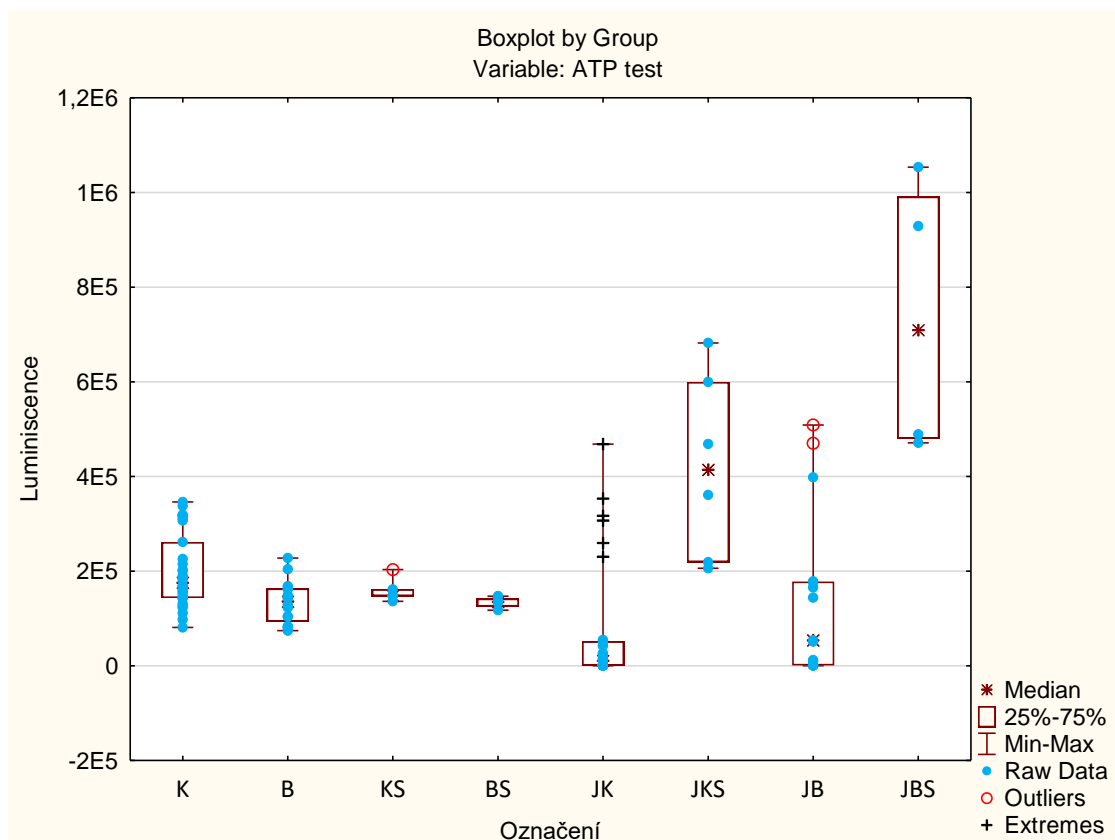
Obr. 40: Proliferační ATP test na PCL nanovlákněch, kde data byla normalizovaná vůči kontrole (nanovláknům bez úpravy). Pozorovala se také proliferace v závislosti na stáří nanovláken. K – nemodifikovaná PCL nanovláknina, PP – PCL nanovláknina s plazmovým polymerem (stáří 6 týdnů), PP+KOL – PCL nanovláknina s PP a kolagenem (stáří 6 týdnů), PP1 – nanovláknina s PP (stáří 4 týdny), PP+KOL1 – nanovláknina s PP a kolagenem (Stáří 6 týdnů), PP2 – nově zvlákněná nanovláknina s PP, PP+KOL2 – nově zvlákněná nanovláknina s PP a kolagenem. Vyseto 50 000 VSMC buněk do každé jamky kromě jedné sady, kdy bylo vyseto pouze 30 000 buněk.

#### 4.4 Proliferační testy na těsnost korunek CellCrown™

Vzhledem k předešlým nesourodým výsledkům vznikly pochybnosti, jestli buňky neprochází kromě mezer mezi korunkou a nanovláknem také skrz nanovlákná, proto místo klasických nanovláken byl navíc proliferační test prováděn na kvalitních bezperličkových nanovlákních. Bylo přichystáno 10 neupravených PCL vláken s tím, že byly použity 4 vzorky bezperličkových vláken. V rámci ATP testu byly také sledovány korunky CellCrown™, jestli na nich dobře drží PCL nanovlákná a jak moc dochází k úniku mezi mezerami. Použila se půlka nových korunek a půlka starších, které mají u označení S (např. označení KS udává: Byla použita „horší“ PCL nanovlákná, která byla uchycena na starší korunku a označení B udává: Byla použita bezperličková nanovlákná uchycená na novou korunku).

Nejprve se sledovala proliferace buněk na neupravených PCL vlákních, kdy se korunky s nanovláknem vyjmuly z kultivační destičky a provedl se ATP test uvnitř těchto korunek. Poté se ATP test provedl i v jamkách, ve kterých byly korunky během kultivace umístěny. Sledovalo se tedy to, kolik buněk zůstane na nanovlákních a kolik buněk projde skrz určité skulinky mezi nanovláknem a korunkou, uchytí se na kultivačním plastiku a proliferuje tam. Výsledky byly zaznamenány do grafu Obr. 41. Z přiloženého grafu jsme potvrdili, že buňky skrze korunky procházejí. Bylo také potvrzeno, že při použití starších korunek, dochází k většímu úniku buněk, než je tomu v případě nových korunek, což lze pozorovat na bezperličkových nanovlákních, kde je rozdíl až čtyřnásobný. Jelikož se jednalo o experiment, kdy byly zajištěny stejné podmínky, je otázkou, proč vycházely tak velké rozptyly mezi jednotlivými nanovláknem.

Problém se nakonec vyřešil tak, že jsme při vysetí buněk do korunek nepipetovali 1 ml média s buňkami jako v předešlých případech, ale pipetovali jsme pouze takové množství, aby hladina roztoku nepřesáhla díry v korunce (asi 200 µl) a poté, až se buňky usadili na PCL vlákních, jsme dopipetovali na 1ml, aby buňky rostly ve standardních podmínkách. Při použití této metody se nám podařilo zamezit propustnost buněk korunkou. Později byl problém s propustností korunkami vyřešen tak, že se místo plastových korunek CellCrown nanovlákná upevňovala na speciálně vyrobené skleněné válečky, které již nepropouštěly žádné buňky. Stále však přetrvával problém, že se nepodařilo sjednotit výsledky tak, aby pro stejná vlákna vycházely stejné hodnoty. Protože jsme nemohli zjistit, co je příčinou problému, upustili jsme od nanovláken a začali jsme zkoumat proliferaci přímo na polystyrenových kultivačních miskách, které byly modifikovány stejně jako nanovlákná, za účelem zjištění, která vrstva je pro proliferaci nejlepší a která činí problém.



Obr. 41: Proliferační ATP test na stanovení úniku buněk mezi mezerami v korunkách CellCrown<sup>TM</sup>. K – PCL nanovlákná, KS – PCL nanovlákná uchycená na starou korunku, B – bezperličková PCL nanovlákná, BS – bezperličková nanovlákná uchycená na starou korunku, JK – uniklé buňky v jamce kultivační destičky po vyndání K, JKS – uniklé buňky v jamce kultivační destičky po vyndání KS, JB – uniklé buňky v jamce kultivační destičky po vyndání B, JBS – uniklé buňky v jamce kultivační destičky po vyndání BS.

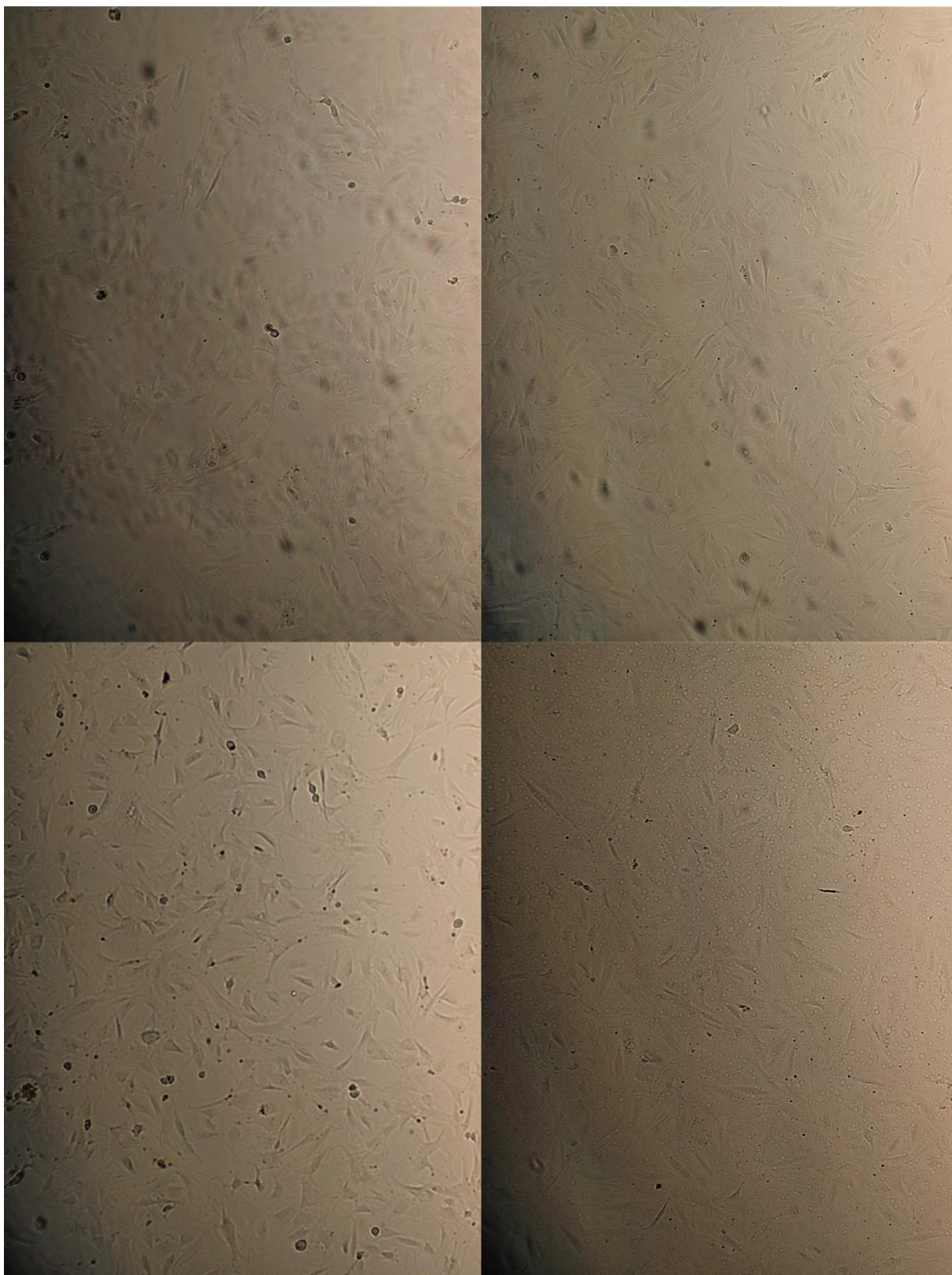
## 4.5 Proliferační testy na kultivačních miskách

### 4.5.1 Proliferace VSMC na kultivačních miskách

Při modifikaci povrchu kultivační misky bylo postupováno stejně jako u nanovláken. Byly připraveny čtyři druhy kultivačních misek. První typ neobsahoval žádnou naši modifikaci povrchu, jednalo se čistě o polystyrenovou misku, která sloužila jako kontrola (označení K). Druhý typ kultivační misky byl modifikován pouze plazmovým aminovým polymerem, bylo třeba misky umístit do plazmového reaktoru a vrstvu nadeponovat (označení PP). Třetí typ kultivační misky byl modifikován plazmovým aminovým polymerem a po vyjmutí z plazmového reaktoru byl na plazmový polymer imobilizován kolagen po dobu 16 hodin (označení PP+KOL). Jako čtvrtý typ kultivační misky byla vyzkoušena imobilizace kolagenu (po dobu 16 hodin) přímo na neupravený povrch misky bez plazmového polymeru (označení KOL). Na jednotlivé misky byly poté aplikovány VSMC buňky po 30 000, a byla pozorována proliferace buněk.

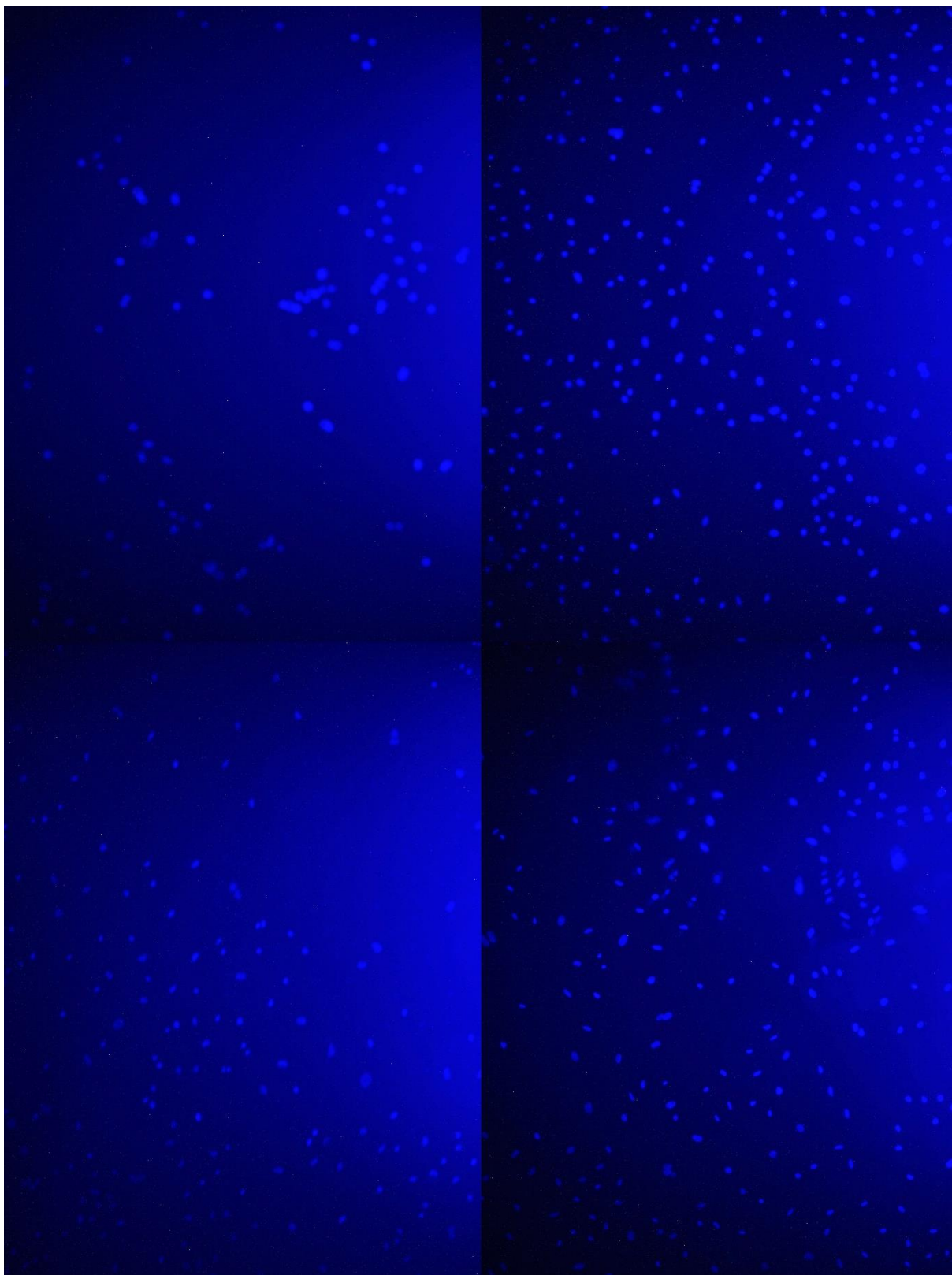
Nejprve byly jednotlivé misky pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. Fotky z mikroskopu jsou připojeny na Obr. 42. Jak lze pozorovat, buňky byly viditelné na každém typu kultivační misky pocitově nejvíce právě na povrchu, který byl modifikován plazmovým aminovým polymerem. Byla navržena následující teorie: Jelikož je plazmový aminový polymer vysoce reaktivní, tedy že obsahuje na svém povrchu aminové skupiny  $\text{NH}_x$ , je možné, že by plazmový polymer mohl reagovat s uvolněným ATP. To by znamenalo, že ATP, které se uvolní po lýze buňky, okamžitě reaguje s plazmovým polymerem a nezbude tak dostatečné množství na štěpení luciferinu. Z toho by vyplávalo, že proliferační test na stanovení relativního množství ATP na površích s PP nelze brát jako validní.

Pro potvrzení této teorie bylo připraveno 10 sad modifikovaných kultivačních misek, které byly vyhodnoceny metodou na stanovení relativního množství ATP, resazurinovým barvením, a byly sledovány pod fluorescenčním mikroskopem s použitím Hoechstova barviva. Hoechstovo barvivo se váže na dsDNA a emituje modré záření, což nám umožnilo zviditelnit buňky přítomné na povrchu misky, a bylo je tak možné manuálně spočítat. Fotky (Obr. 43) pořízené z mikroskopu byly otevřeny pomocí programu ImageJ (Fiji), pomocí kterého byly spočítány viditelné buňky.



*Obr. 42: Proliferace VSMC na kultivačních miskách zobrazené pod mikroskopem. (Vlevo nahoře – K; Vpravo nahoře – KOL; Vlevo dole – CPA; Vpravo dole – CPA+KOL).*

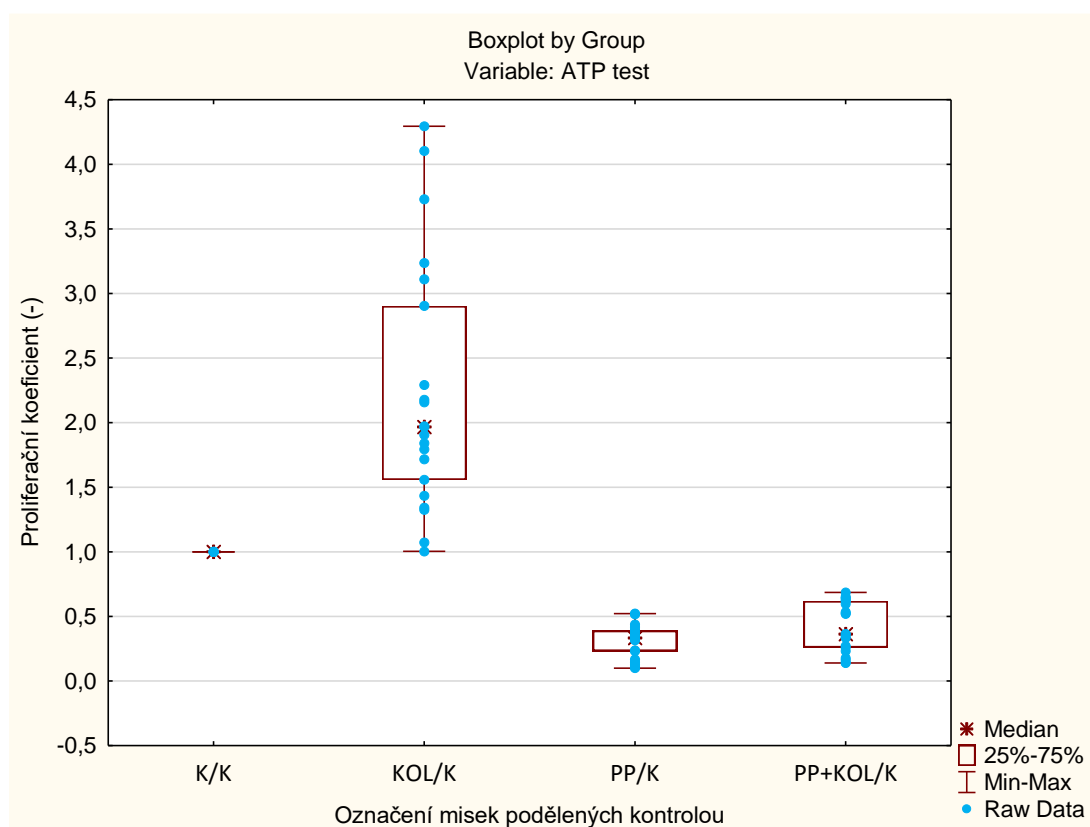




*Obr. 43: Proliferace VSMC na kultivačních miskách zobrazené pod fluorescenčním mikroskopem obarvené Hoechstovým barvivem (Vlevo nahoře – K; Vpravo nahoře – KOL; Vlevo dole – CPA; Vpravo dole – CPA+KOL).*

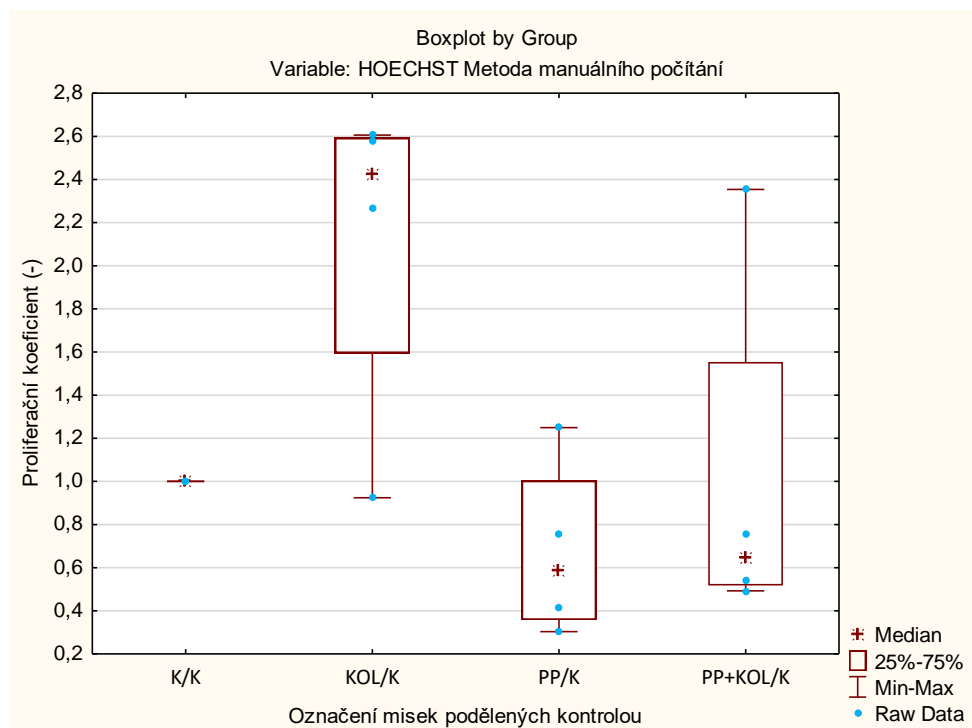
Všechny dosažené výsledky jsou shrnuty na Obr. 44, Obr. 45 a Obr. 46. Vyhodnocení pomocí Hoechstova činidla a manuálního počítání (Obr. 45) vykazovalo stejný trend jako ATP test (Obr. 44). Mohli jsme tedy tvrdit, že ATP test je brán jako validní test a PP nereaguje s uvolněným ATP při lýze buněk. U obou testů byl pozorován zajímavý fakt, že nejvíce buněk proliferovalo na misce, která byla upravena pouze kolagenem bez plazmového polymeru, což by mělo za následek, že úprava plazmovým polymerem by byla zbytečná. V porovnání však s proliferačním testem resazurinového barvení vycházela úprava plazmový polymer a kolagen pro proliferaci buněk nejlépe.

Pro porovnání všech tří metod jsme provedli statistickou analýzu hlavních komponent (Obr. 47). Zde je vidět, že podle Hoechst a ATP nejlepších proliferačních výsledků dosahuje vrstva pouze s kolagenem, kdežto podle resazurinu nejlepších výsledků dosahuje vrstva s PP+KOL. Z veškerých dosažených výsledků nemůžeme jednoznačně potvrdit, která úprava je nejlepší, proto byly na modifikované misky vysety i jiné buňky, a to na lidské keratinocyty HaCaT. Jiné buňky se vybraly proto, abychom potvrdili, jestli odlišnost ve výsledcích není způsobena typem buněk, a také, abychom zjistili, jestli při použití jiného typu buněk nevykazuje modifikace povrchu plazmovým polymerem (a kolagenem) lepších výsledků.

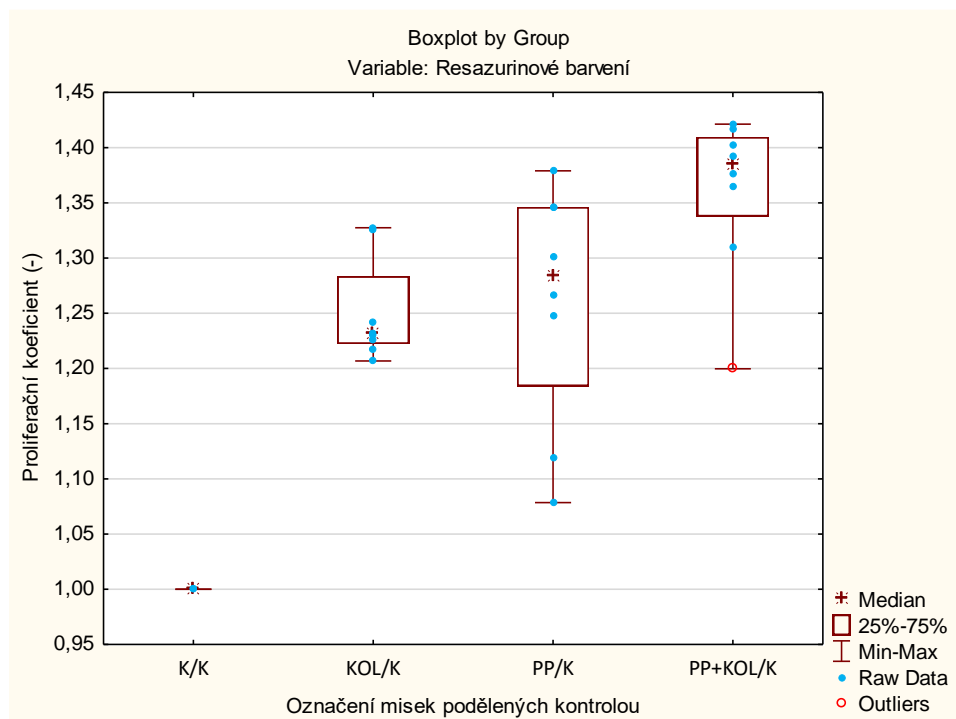


Obr. 44: Proliferační ATP test na kultivačních miskách, kde data byla normalizována vůči kontrole (miskám bez úpravy) a vypočítán tzv. proliferační koeficient. K–nemodifikované kultivační misky, KOL – miska s kolagenem, PP–miska s plazmovým polymerem, PP+KOL – miska s PP a kolagenem. Vyseto po 30 000 VSMC buněk do každé misky.

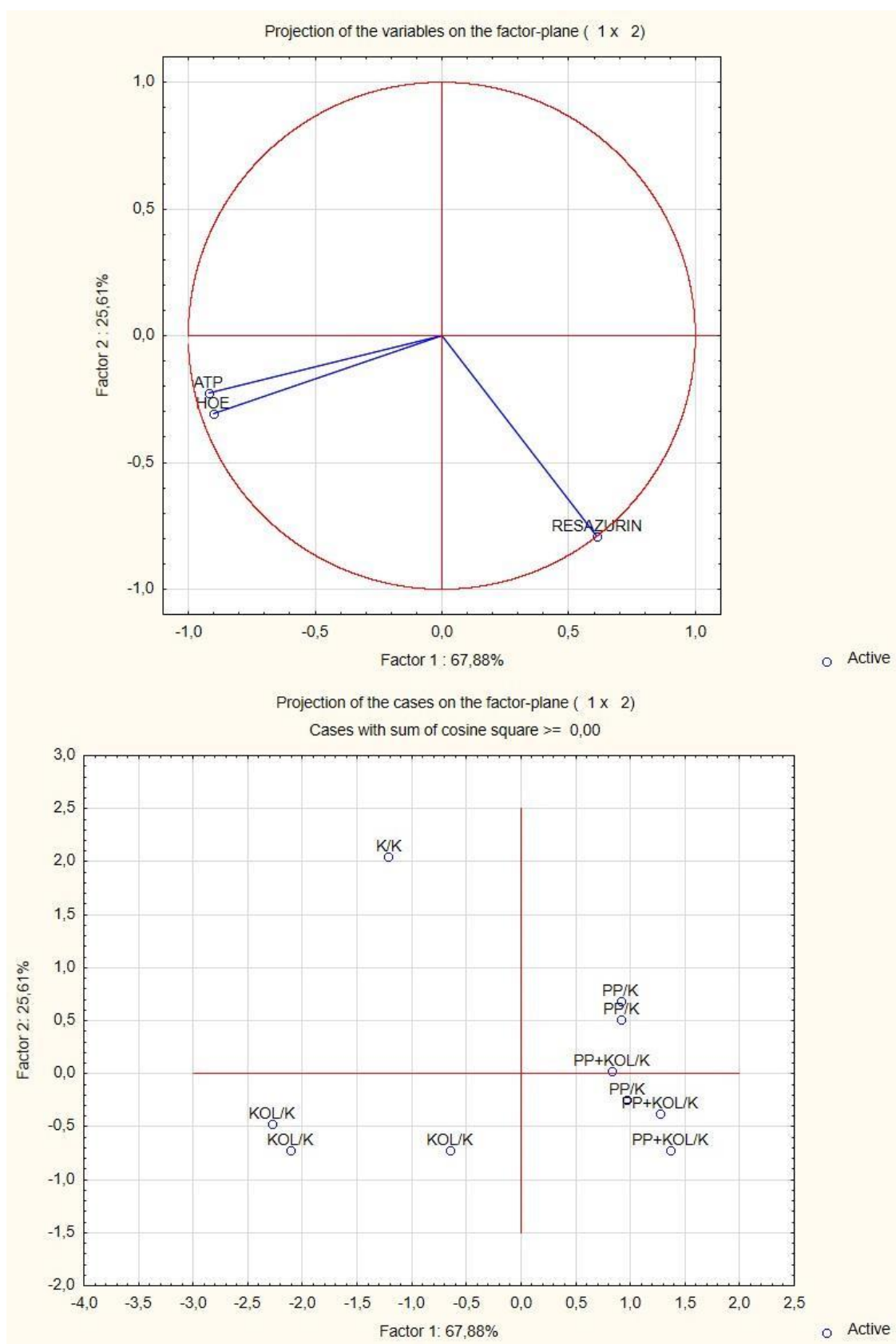




Obr. 45: Proliferační test na manuální počítání buněk s použitím Hoechstova barviva na kultivačních miskách. Data byla normalizována vůči kontrole (miskám bez úpravy) a vypočítán tzv. proliferační koeficient. K – nemodifikované kultivační misky, KOL – miska s kolagenem, PP – miska s plazmovým polymerem, PP+KOL – miska s PP a kolagenem Vyseto po 30 000 VSMC buněk do každé misky.



Obr. 46: Proliferační test s použitím resazurinu na kultivačních miskách. Data byla normalizována vůči kontrole (miskám bez úpravy) a vypočítán tzv. proliferační koeficient. K – nemodifikované kultivační misky, KOL – miska s kolagenem, PP – miska s plazmovým polymerem, PP+KOL – miska s PP a kolagenem Vyseto po 30 000 VSMC buněk do každé misky.



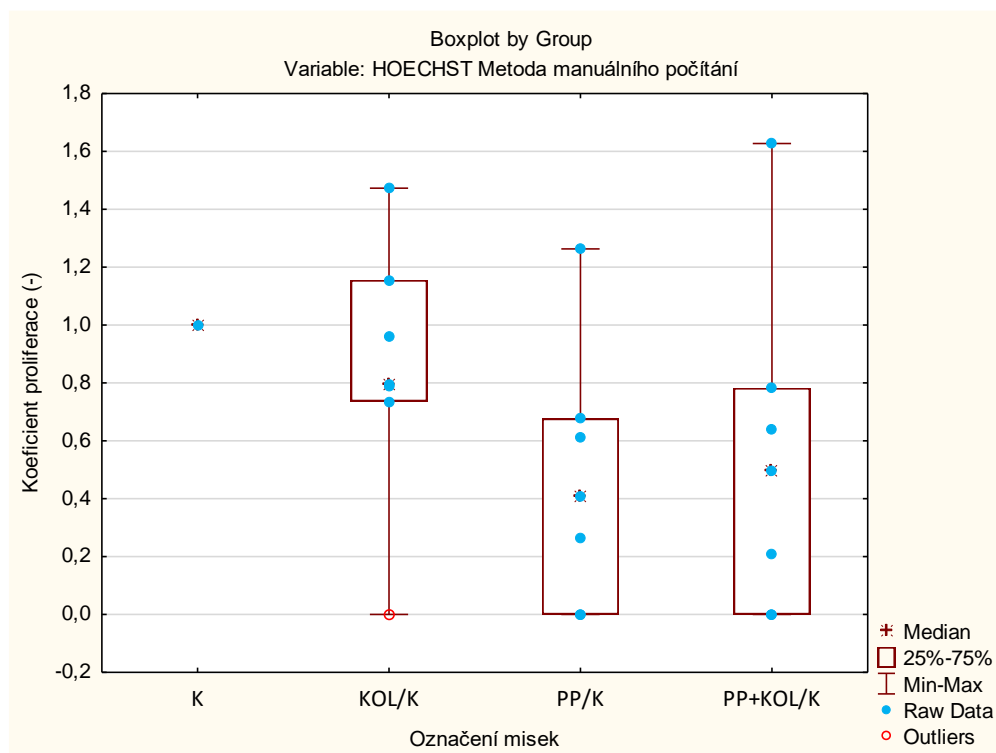
Obr. 47: Analýza hlavních komponent pro RESAZURIN, HOECHST a ATP proliferační test. Data byla standardizována v programu Statistica a výsledky byly promítnuty do Faktoru 1 a 2, které obsahovaly 67,88 % a 25,61 % původní variability všech proměnných.

#### 4.5.2 HaCaT buňky

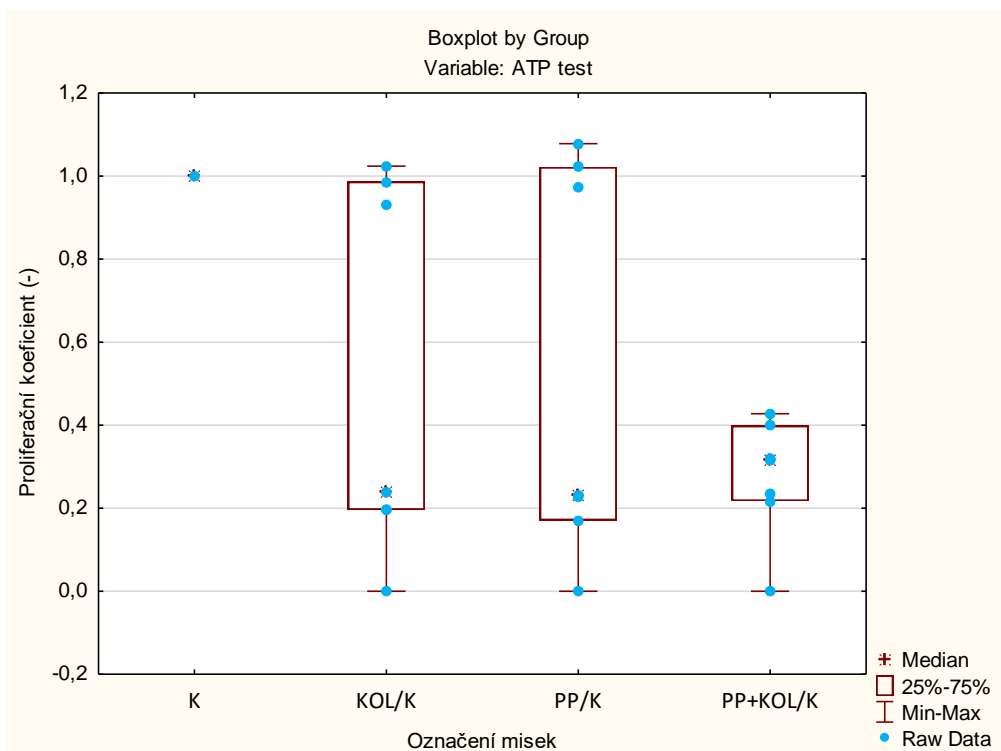
Pro porovnání vyhodnocovacích proliferačních metod, byly vybrány stejně modifikované povrchy jako pro buňky VSMC, tedy miska bez úpravy (K), miska s plazmovým polymerem (CPA), miska s PP a kolagenem (CPA+KOL) a miska s kolagenem (KOL). Do každé misky bylo vyseto po 30 000 buněk lidských keratinocytů (HaCaT), a nechaly se inkubovat po dobu 2 dní. Po uplynutí doby se proliferace buněk v jednotlivých miskách vyhodnotila pomocí ATP testu, testu s použitím fluorescenčního barviva resazurinu a manuálního počítání buněk pod fluorescenčním mikroskopem za použití Hoechstova barviva.

Dosažené výsledky z každého vyhodnocovacího testu byly zaznamenány do tří grafů (Obr. 48, Obr. 49 a Obr. 50). Z výsledků nemůžeme jednoznačně potvrdit, která modifikace byla pro buňky nejpřívětivější, protože např. u počítání s Hoechstovým barvivem (Obr. 48) a ATP testu (Obr. 49) vyšla proliferace pro povrch PP+KOL hůř než na nemodifikované misce, ale u resazurinu (Obr. 50) vyšla proliferace na tomto povrchu lépe v porovnání s nemodifikovaným povrchem. Je však nutno zdůraznit, že plastová miska je již upravena pomocí plazmatu pro ideální růst buněk.

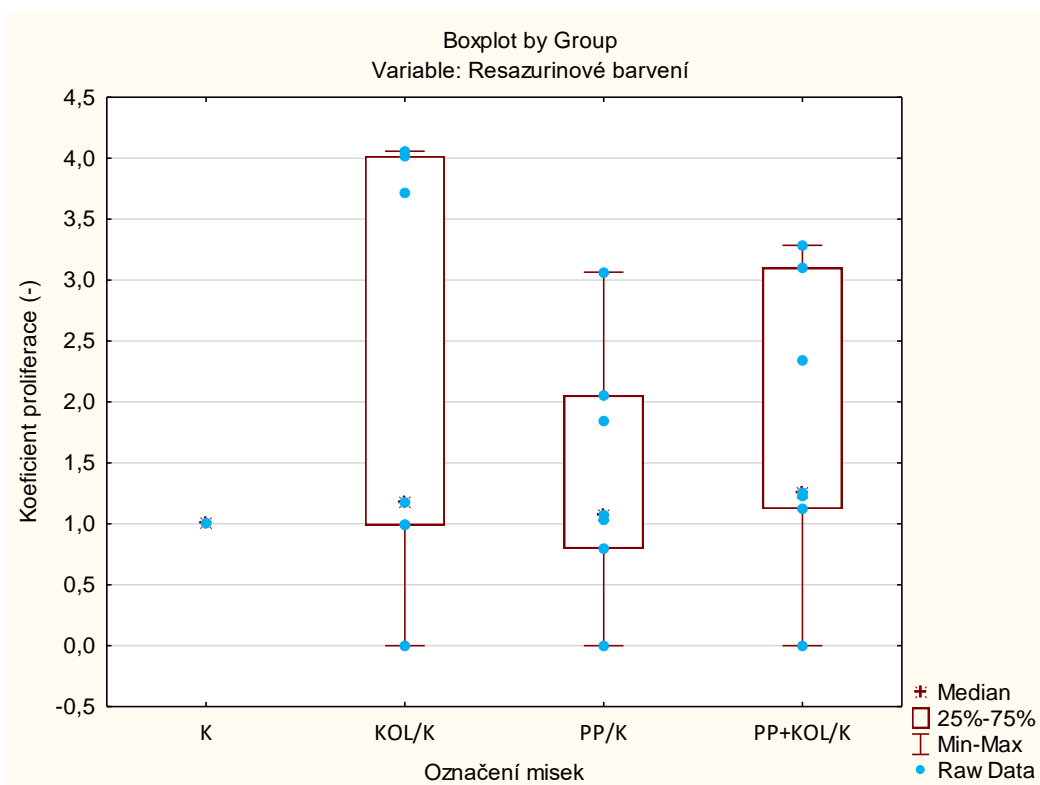
Provedli jsme ještě statistickou analýzu hlavních komponent, abychom porovnali metody mezi sebou. Výsledek (Obr. 51) udává, že se metody od sebe liší. Jelikož po obarvení Hoechstovým barvivem buňky na povrchu přímo manuálně počítáme, je pravděpodobné, že se dá tomuto výsledku věřit více než ostatním metodám. Bude potřeba ještě detailněji prozkoumat metodu s resazurinem, protože, i když jako jediná poskytuje pro vrstvu PP+KOL lepší výsledky, což je naším cílem, se od ostatních metod odlišuje.



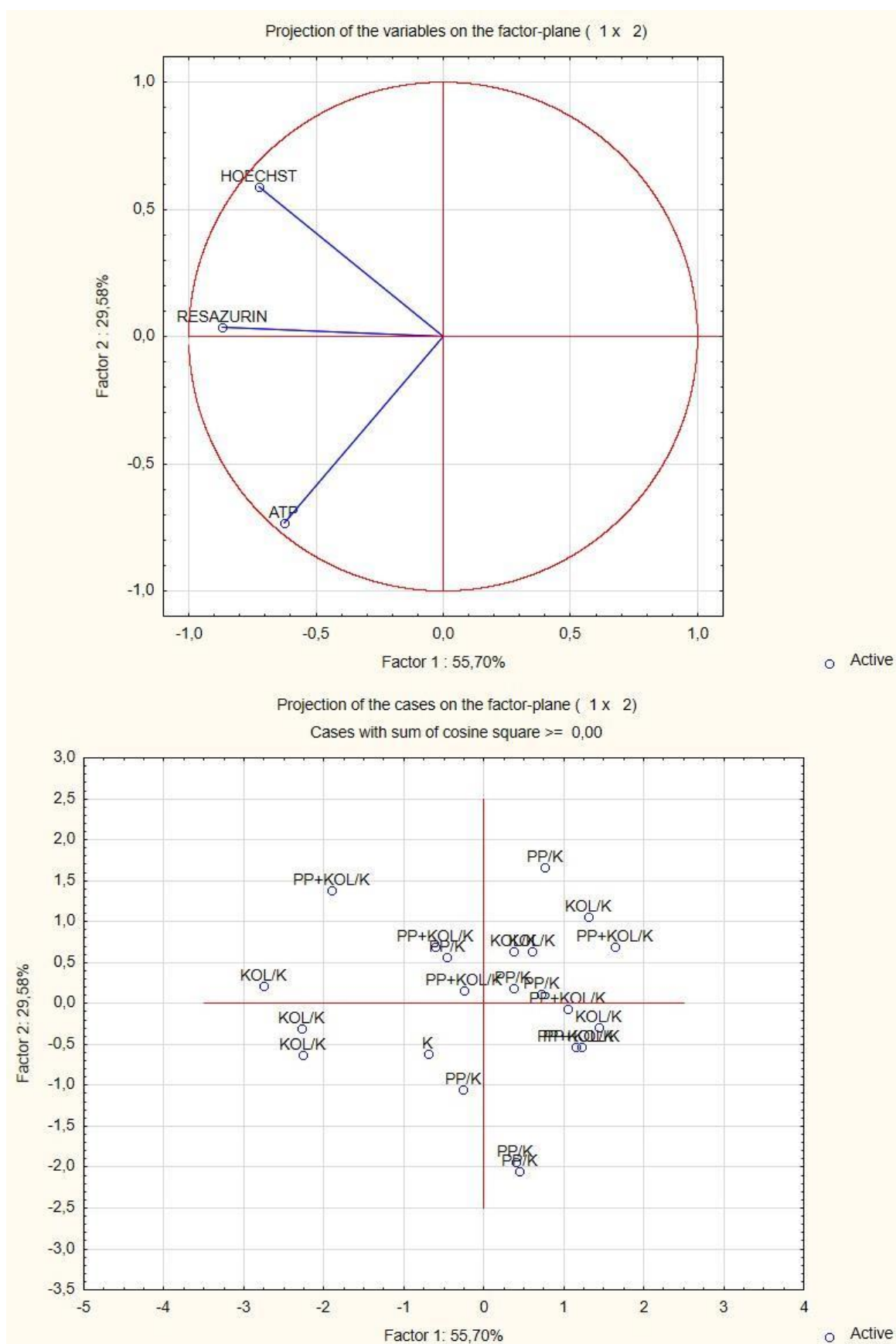
Obr. 48: Proliferační test na manuální počítání buněk s použitím Hoechstova barviva na kultivačních miskách. Data byla normalizována vůči kontrole (miskám bez úpravy) a vypočítán tzv. proliferační koeficient. K – nemodifikované kultivační misky, KOL – miska s kolagenem, PP – miska s plazmovým polymerem, PP+KOL – miska s PP a kolagenem. Vyseto po 30 000 VSMC buněk do každé misky.



Obr. 49: Proliferační ATP test na kultivačních miskách. Data byla normalizována vůči kontrole (miskám bez úpravy) a vypočítán tzv. proliferační koeficient. K–nemodifikované kultivační misky, KOL – miska s kolagenem, PP–miska s plazmovým polymerem, PP+KOL – miska s PP a kolagenem Vyseto po 30 000 VSMC buněk do každé misky.



Obr. 50: Proliferační test s použitím resazurinu na kultivačních miskách. Data byla normalizována vůči kontrole (miskám bez úpravy) a vypočítán tzv. proliferační koeficient. K–nemodifikované kultivační misky, KOL – miska s kolagenem, PP–miska s plazmovým polymerem, PP+KOL – miska s PP a kolagenem Vyseto po 30 000 VSMC buněk do každé misky.



Obr. 51: Analýza hlavních komponent pro RESAZURIN, HOECHST a ATP proliferační test s použitím HaCaT buněk. Data byla standardizována v programu Statistica a výsledky byly promítnuty do Faktoru 1 a 2, které obsahovaly 55,70 % a 29,58 % původní variability všech proměnných.

Z veškerých dat, která byla pořízena na sledování nejlepší proliferace buněk na modifikovaném povrchu, jsme dospěli k závěru, že u misek se nejlíp daří buňkám na povrchu modifikovaném pouze kolagenem. Pokud použijeme plazmový polymer, ať už samotný nebo v kombinaci s kolagenem, tak ve většině případů dosahuje horších výsledků než miska bez modifikace, z čehož můžeme vyvodit, že PP z CPA není vhodnou modifikací pro proliferaci buněk.

Při pozorování misek pod fluorescenčním mikroskopem byl však pozorován zajímavý fakt, a to, že misky, které byly podrobeny depozici a zároveň imobilizaci kolagenu, na svém povrchu obsahují kolečka. Tento jev je zachycen na Obr. 52. Jedná se o misku CPA+KOL, tedy misku upravenou PP, na který byl nanesen roztok PBS+CH<sub>3</sub>COOH+kolagen. Z toho lze vyvodit, že kolečka mohou být způsobena rozpouštěním vrstvy PP při působení roztoku PBS+CH<sub>3</sub>COOH, protože na ostatních miskách tento jev pozorován nebyl. Při bližší analýze pomocí SEM (viz 4.2.3) byla kolečka také pozorována na misce s PP, která byla vystavena roztoku PBS+CH<sub>3</sub>COOH. Lze z toho potvrdit, že PBS+CH<sub>3</sub>COOH vrstvu PP rozpouští.

Na Obr. 52 byla však rozpustnost PP pozorována pouze v pravém horním rohu, kdežto zbytek misky zůstal nerozpuštěný. Bylo také pozorováno, že buňky proliferují pouze v místech, kde vrstva rozpuštěná není, proto je vysoce pravděpodobné, že tento fakt ovlivnil výsledky proliferace buněk jak na miskách, tak na nanovlákních. Další fakt je, že na Obr. 52 je rozpustnost pozorována pouze na jednom místě, ale zbytek povrchu zůstává nepoškozený. To může být příčinou, proč nám někdy vycházel povrch CPA+KOL jako nejlepší povrch pro proliferaci buněk, a jindy zase jako nejhorší. Tento poznatek o rozpustnosti PP byl potvrzen již dříve, ale až nyní se potvrdilo, že to ovlivňuje i proliferaci buněk. Abychom tento jev odstranili, bude potřeba roztok PBS+CH<sub>3</sub>COOH nějakým způsobem modifikovat, aby nedocházelo k rozpouštění PP, ale zároveň v něm byl rozpustný kolagen, anebo použít úplně jiný roztok pro imobilizaci kolagenu na PP, to by však vyžadovalo celou novou studii.



*Obr. 52: Miska CPA+KOL modifikována PP a PBS+CH<sub>3</sub>COOH+kolagen. Znázornění rozpustnosti vrstvy v pravém horním rohu a růstu buněk na nerozpuštěných částech misky.*

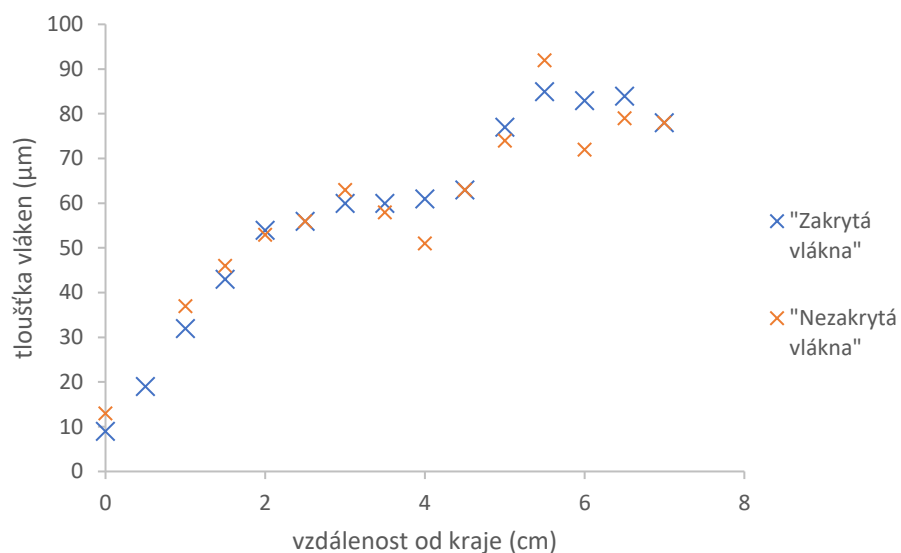
## 4.6 Úprava PCL vláken antibakteriální látkou

Cílem diplomové práce bylo také připravit PCL vlákna s antibakteriální vrstvou. Pro tento účel byla vybrána depozice Cu na PCL vlákna. Měď byla na PCL vlákna nadeponována pomocí metody magnetronového naprašování a charakteristika PCL vláken po depozici byla provedena pomocí XPS, SEM a EDS. Byly upraveny dva typy PCL nanovláken, kde vlákna se mezi sebou lišila tím, že jeden typ měl při magnetronovém naprašování zakryté okraje a spodní stranu, aby nedocházelo k nadeponování Cu na spodní stranu PCL vláken, a druhý typ nanovláken zakrytý nebyl. Depoziční podmínky pro magnetronové naprašování jsou shrnuty v Tabulce 1. Tloušťka „zakryté“ a „nezakryté“ nanovláčkové membrány v závislosti na vzdálenosti od kraje je znázorněna na Obr. 53.

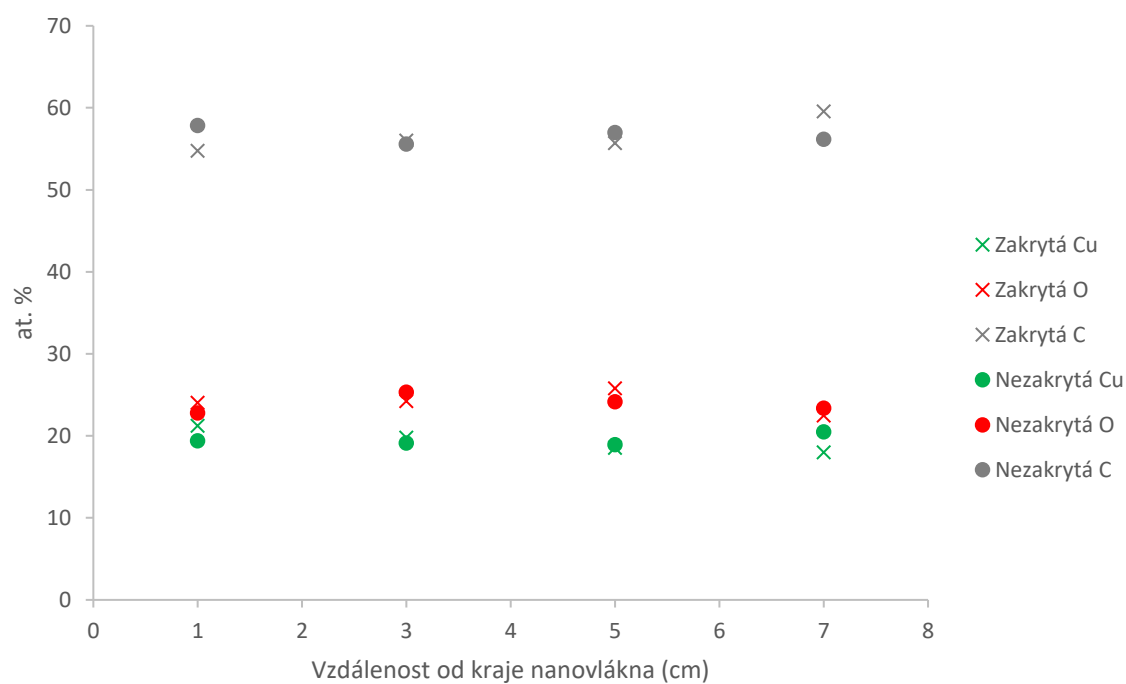
Nejprve byla provedena XPS analýza. Oba typy nanovláken byly změřeny z vrchní i ze spodní strany a byla také sledována závislost, jestli je v rámci vzdálenosti od nejtěsnějšího k nejtlustšímu kraji pozorována změna ve složení nanovláken. Výsledky pro vrchní stranu vláken jsou znázorněny na Obr. 54 a pro spodní stranu vláken na Obr. 55. Z pořízených dat (Obr. 54) jsme jednoznačně potvrdili přítomnost Cu na vrchní straně u obou typů vláken. Procentuální složení mědi se pohybovalo kolem 20 at. % a měď tak homogenně pokrývala vrchní stranu vláken. Z Obr. 55 jsme také prokázali, že měď se na spodní straně nevyskytovala, pouze bylo zaznamenáno stopové množství u nejtěsnější vrstvy PCL vláken. Proto můžeme tvrdit, že nehraje žádný vliv, pokud PCL vlákna při magnetronovém naprašování zakryjeme či nikoliv.

Pro vizuální kontrolu vláken byla provedena SEM analýza. Pořízené fotky jsme shrnuli na Obr. 56. První tři obrázky znázorňují zakrytá PCL vlákna a další tři nezakrytá. Na žádné z fotek není pozorována deformace nanovláken ani případné shluky částic mědi. Není také patrný žádný rozdíl mezi zakrytými a nezakrytými nanovláčky. Byla také změřena tloušťka jednotlivých vláken (Obr. 57). Průměr všech vláken se pohybuje okolo 180 nm, což také potvrzuje, že vrstva mědi byla nanášena homogenně. Pro detailnější prozkoumání nanosené mědi se vzorky podrobily EDS. Pro oba typy vláken byl pořízen graf (Obr. 58) zastoupení prvků na sledovaném místě. Bylo úspěšně potvrzeno, že oba typy vláken obsahují Cu, takže byla potvrzena úspěšná depozice i podle jiné techniky. Dále byly pořízeny detailnější mapy prvků pro „zakrytá“ vlákna (Obr. 59) a pro „nezakrytá“ vlákna (Obr. 60). Z pořízených prvkových map můžeme jednoznačně potvrdit přítomnost Cu, O a C. Případně můžeme vzít v potaz K, Ca a Cl jako nečistoty na určitých místech. Na Obr. 59 a Obr. 60 mapy Cu zobrazují přítomnost Cu kopírující morfologii nanovláken, a tak z obou map můžeme opět vyvodit závěr, že jsou vlákna homogenně potažena. Z časových důvodů již bohužel nebylo možné provést na vláknech potažených mědí antibakteriální testy.

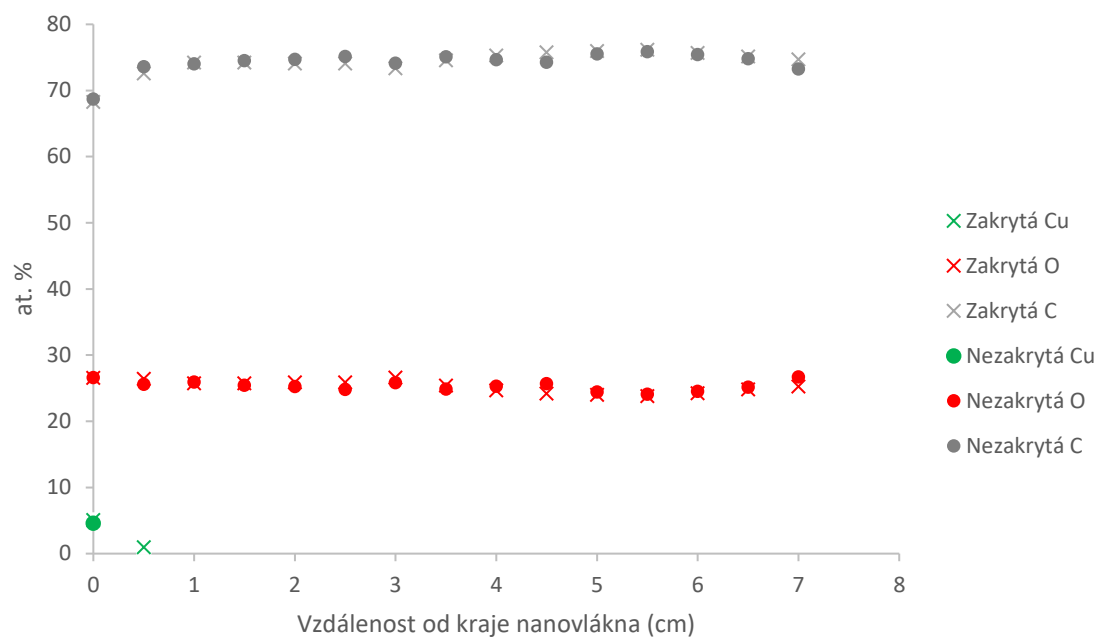




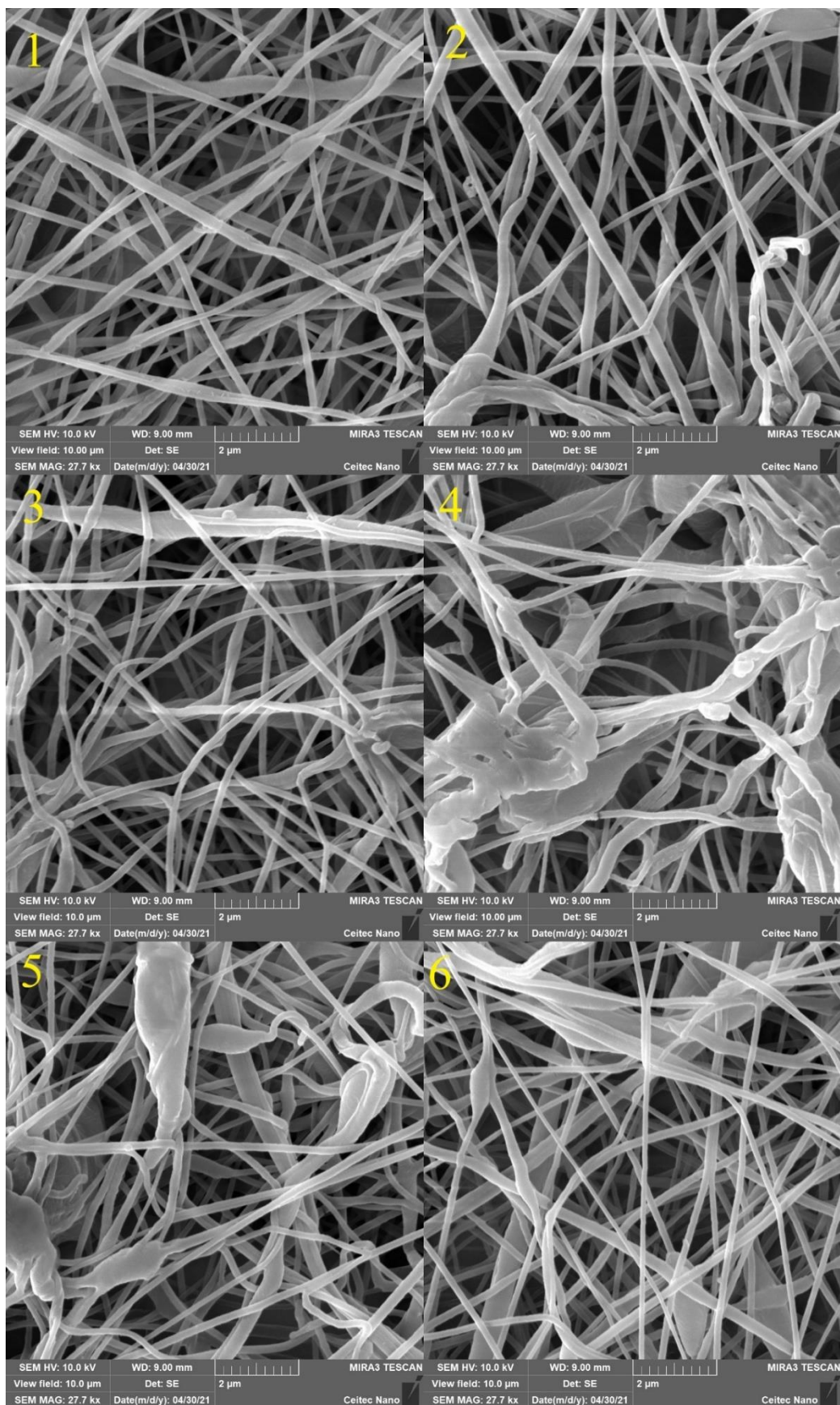
Obr. 53: PCL vlákna podrobená magnetronovému naprašování Cu. Jeden typ vláken při naprašování neměl zakryté okraje, a druhý ano. Graf znázorňuje tloušťku nanovláknenné membrány v jednotlivých místech v závislosti na vzdálenosti od kraje nanovláknenné membrány.



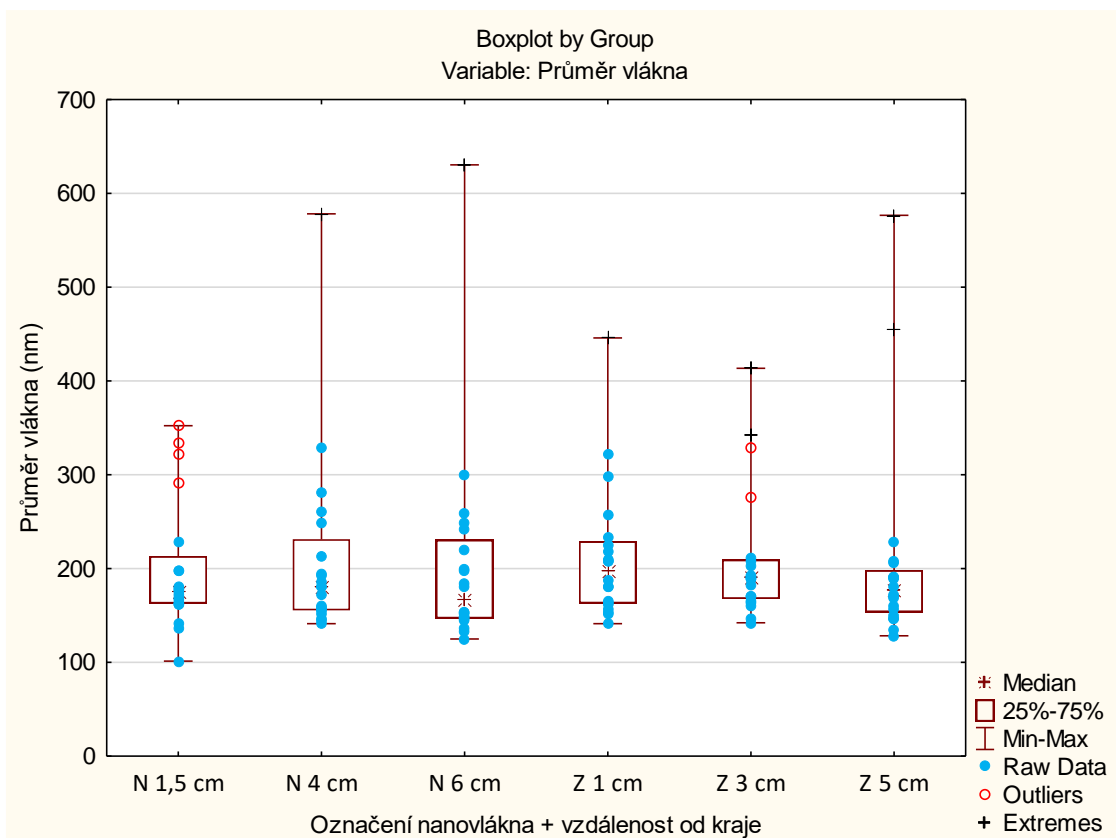
Obr. 54: XPS analýza vrchní strany PCL nanovláken upravených magnetronovým naprašováním. Graf znázorňuje složení vrstvy v závislosti na vzdálenosti od kraje nanovláken a v závislosti na typu nanovláken.



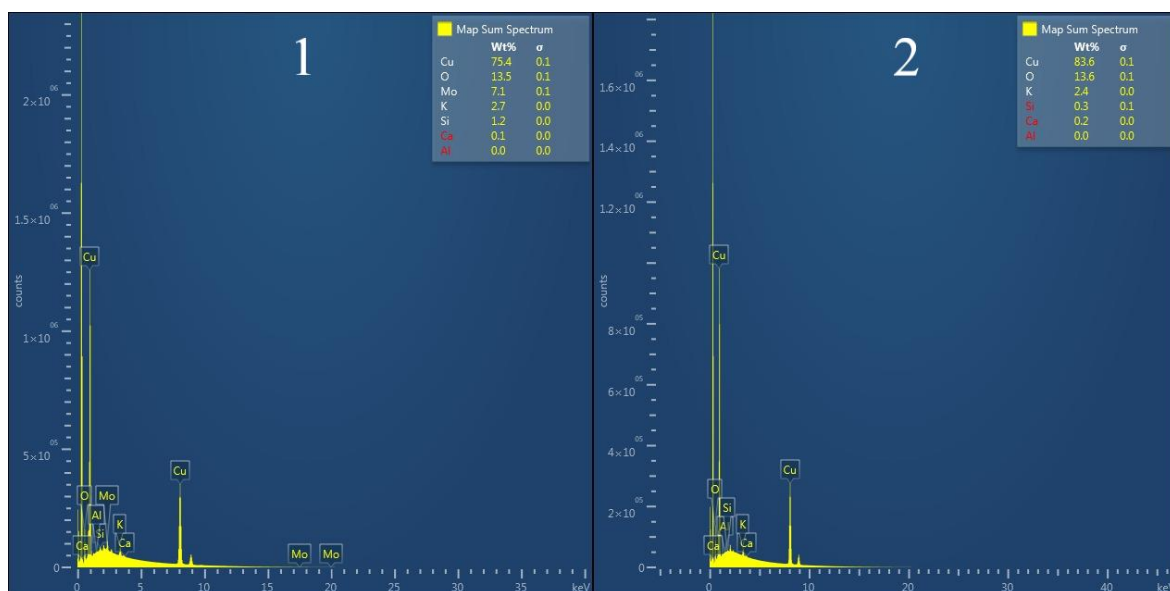
Obr. 55: XPS analýza spodní strany PCL nanovláken upravených magnetronovým naprašováním. Graf znázorňuje složení vrstvy v závislosti na vzdálenosti od kraje nanovláken a v závislosti na typu nanovláken.



Obr. 56: Zobrazení PCL vláken modifikovaných Cu pomocí SEM. U všech fotek je zobrazovací oblast 10 µm. 1 – zakrytá PCL vlákna 1 cm od kraje, 2 – zakrytá PCL vlákna 3 cm od kraje, 3 – zakrytá PCL vlákna 5 cm od kraje, 4 – nezakrytá PCL vlákna 1,5 cm od kraje, 5 – nezakrytá PCL vlákna 4 cm od kraje, 6 – nezakrytá PCL vlákna 6 cm od kraje.

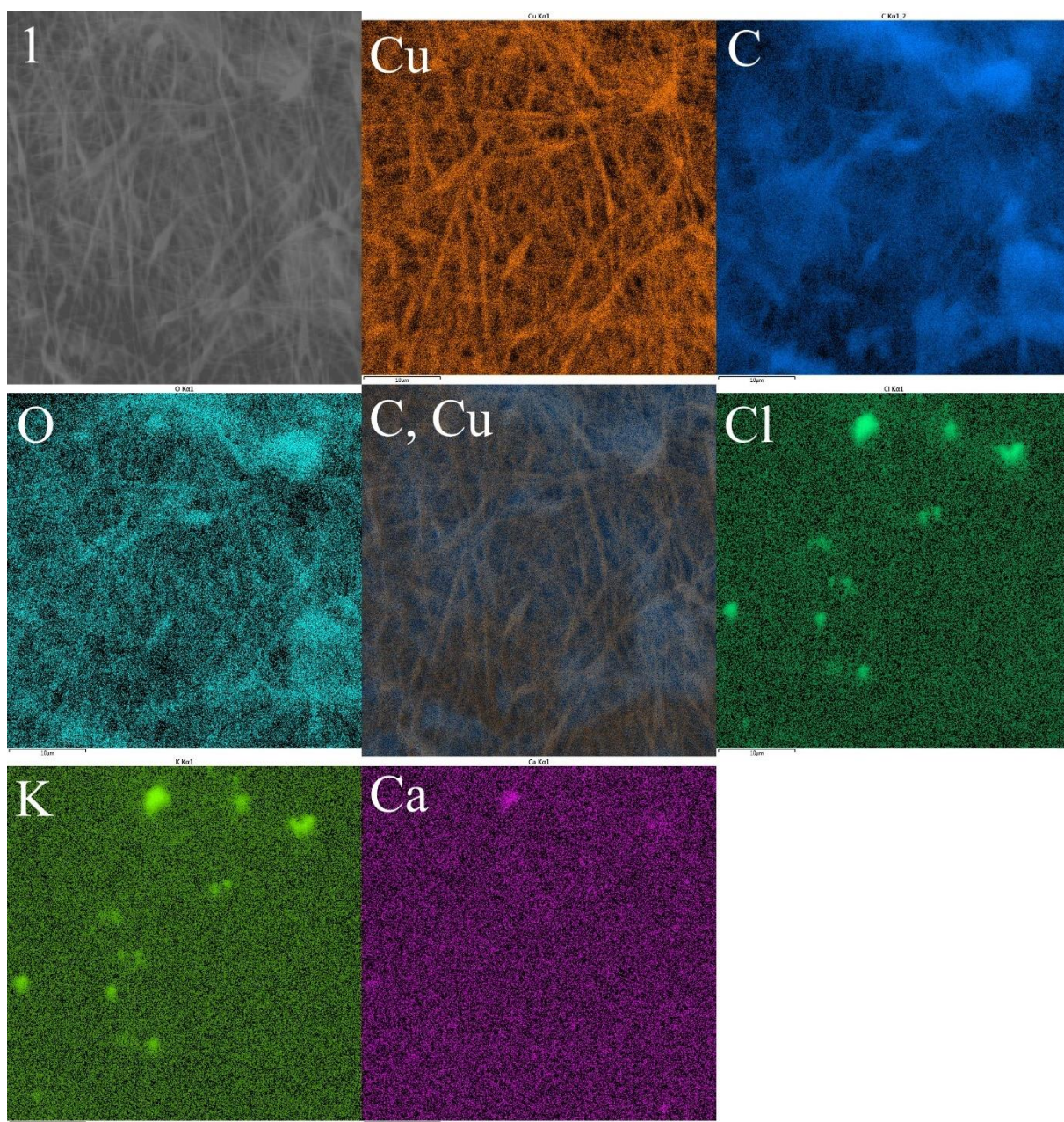


Obr. 57: Graf znázorňující průměr PCL vláken modifikovaných Cu. Označení N 1,5 cm znamená PCL vlákna, která byla změřena 1,5 cm od kraje a při magnetronovém naprašování neměla zakryté okraje, Z 1 cm znamená, že PCL vlákna byla změřena 1 cm od kraje a při magnetronovém naprašování Cu měla zakryté okraje.



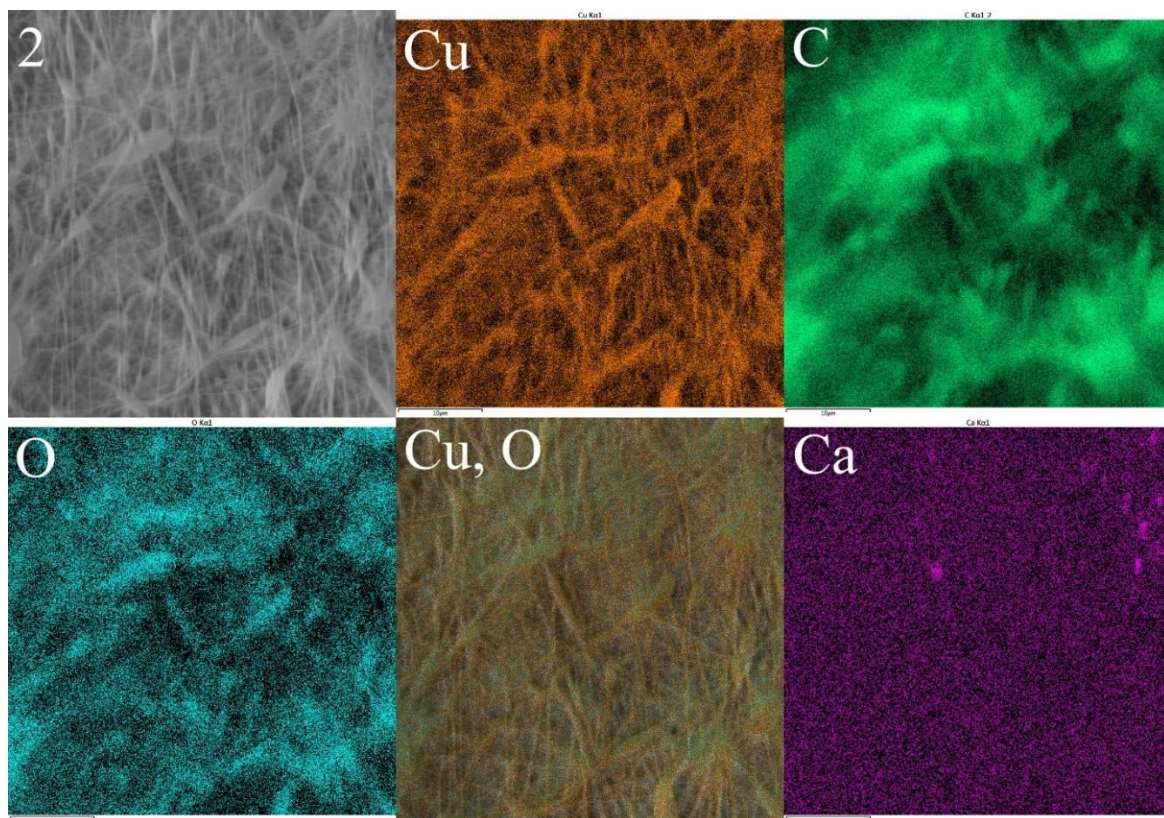
Obr. 58: Grafy pořízené pomocí EDS, udávající složení PCL nanovlákn. 1 – PCL vlákna, která byla zakrytá při magnetickém naprašování, měřená oblast 50  $\mu$ m a vzdálenost od kraje 5 cm; 2 – PCL vlákna, která nebyla zakrytá při magnetickém naprašování, měřená oblast 50  $\mu$ m a vzdálenost od kraje 6 cm.





*Obr. 59: EDS mapy složení PCL vlákna, které bylo zakryté při magnetronovém naprašování Cu. Oblast byla měřena v místě, kde vlákna zakrytá nebyla. Zobrazovaná oblast činila 50 μm a vzdálenost od kraje 5 cm. 1 – snímek ze SEM; ostatní fotky jsou stejné místo, ale s příslušným prvkem popsáním v levém horním rohu.*





*Obr. 60: EDS mapy složení PCL vlákna, které nebylo zakryté při magnetronovém naprašování Cu. Měřená oblast byla 50  $\mu\text{m}$  a vzdálenost od kraje 6 cm. 2 – snímek ze SEM; ostatní fotky jsou stejné místo, ale s příslušným prvkem popsáním v levém horním rohu.*

## 5 ZÁVĚR

V diplomové práci byla zvlákněna PCL nanovláknna, na která jsme deponovali plazmový polymer z CPA a imobilizovali kolagen. Plazmový polymer byl na nanovláknna deponován za stálých podmínek a imobilizace kolagenu byla předmětem této práce. Nejprve jsme zkoumali, jaký typ roztoku se pro imobilizaci kolagenu hodí nejvíce, a dospěli jsme k závěru, že je to roztok kolagenu s kyselinou octovou a fosfátovým pufrům. Po aplikaci roztoku kolagenu na vlákna byla pozorována imobilizace kolagenu na vláknech pomocí SEM a XPS. Dospěli jsme k závěru, že kolagen se na vlákna úspěšně imobilizoval, proto bylo možné přistoupit k sledování proliferace buněk na vláknech.

Jako vzorové buňky byly zvoleny VSMC, které byly vysazeny na nanovláknna, kde jsme sledovali jejich proliferaci pomocí různých testů. Proliferace buněk byla však doprovázena řadou komplikací a nejasností. Někdy se zdálo, že buňky proliferují na vláknech s imobilizovaným kolagenem dobře, a někdy buňky na vláknech vůbec přítomné nebyly. Vznikly pochybnosti ohledně způsobu provedení proliferace buněk na vláknech, konkrétně že byla vlákna uchycena na tzv. korunky CellCrown<sup>TM</sup>. Problém spočíval v tom, že korunky měly na spodní straně vytvořené „záseky“ od výrobce, a pokud se nanovláknna nepřichytila správně, docházelo k úniku buněk právě v těchto mezerách, a na vláknech tak žádné buňky nezůstaly. Tento problém se podařilo vyřešit aplikováním menšího množství média při vysévání buněk. Později se však od těchto korunek upustilo a začaly se používat speciálně vyrobené skleněné válečky, které problém s únikem buněk vyřešily úplně. Stále však mezi stejnými typy nanovláken vycházely pokaždé rozdílné výsledky. Rozhodli jsme se tedy od nanovláken upustit a prozkoumat interakci buněk na polystyrenových kultivačních miskách. Kultivační misky byly modifikovány stejně jako nanovláknna a účelem bylo zjistit, na které vrstvě se buňkám daří nejlépe a která vrstva činí problém.

U proliferčních testů na miskách nebylo dosaženo lepších výsledků, protože pro stejné modifikované misky nebyly dosaženy stejné výsledky. Začalo se uvažovat o tom, jestli vyhodnocovací proliferční ATP test neposkytuje falešné výsledky, protože tento test je založen na sledování uvolněného ATP z buňky a je vysoce pravděpodobné, že by se uvolněné ATP mohlo navázat na vrstvu PP, jelikož je tato vrstva je silně reaktivní. Z toho důvodu bylo provedeno porovnání ATP testu spolu s dvěma dalšími vyhodnocovacími technikami a zároveň bylo provedeno porovnání těchto metod na jiném typu buněk, a to na lidských keratinocytech (HaCaT). Odlišné buňky jsme zvolili z důvodu, že by se interakce s modifikovaným povrchem mohla lišit v závislosti na typu buněk a HaCaT by mohly vykazovat lepší výsledky. Bohužel ani nyní se nepodařilo sjednotit testy mezi sebou a pro stejné misky testované různě vycházel jiný trend. Ze všech dosažených výsledků však převážně vycházela proliferace na povrchu s PP a kolagenem hůře než na misce, ve které byl pouze kolagen.

Na závěr jsme provedli analýzu modifikovaných misek pomocí XPS a SEM. Pod mikroskopem byl zjištěn zajímavý fakt, a to že misky s PP při kontaktu pouze s roztokem PBS+CH<sub>3</sub>COOH vykazují na svém povrchu kolečka. Tato kolečka byla pozorována i na misce s PP+kolagenem+PBS+CH<sub>3</sub>COOH. Z toho lze vydedukovat, že vrstva PP se opravdu působením roztoku PBS+CH<sub>3</sub>COOH rozpouští. Kromě tohoto faktu bylo pozorováno, že na misce s PP+kolagenem+PBS+CH<sub>3</sub>COOH se kolagen nevyskytuje v místech, kde je právě

vrstva PP rozpuštěna. Plocha k navázání kolagenu je tedy značně omezena. Z buněčných experimentů pro sledování proliferace VSMC buněk na miskách je možné doložit fotku misky (Obr. 52), kde je právě rozpustnost vrstvy PP znázorněna. Je zde pozorováno, že se vrstva rozpouští pouze na některých místech a buňkám se daří pouze v místech, kde vrstva PP rozpuštěná není. Tento fakt mohl být jednou z příčin, proč docházelo k nesourodým výsledkům v buněčných experimentech na sledování proliferace buněk. Jelikož se vrstva rozpouštěla nesourodě, miska od misky, byť se stejnou úpravou, se mezi sebou lišily.

I když se nám podařilo na nanovlákná úspěšně imobilizovat kolagen, při aplikaci buněk dochází k nesourodým výsledkům díky aplikaci roztoku PBS+CH<sub>3</sub>COOH, který rozpouští vrstvu PP. Pro další práci bude třeba detailněji prozkoumat interakci PP s PBS+CH<sub>3</sub>COOH, případně upravit roztok PBS+CH<sub>3</sub>COOH, aby nedocházelo k rozpouštění PP, anebo najít úplně nový roztok na imobilizaci kolagenu, který by rozpustil kolagen, a zároveň nerozpouštěl vrstvu PP.

Paralelně se sledováním imobilizace kolagenu na nanovlákněch, jsme v práci na nanovlákná nadeponovali antibakteriální vrstvu Cu. Pro depozici vláken bylo použito metody magnetronového naprašování, která vlákna úspěšně homogenně pokryla. Nanovlákná jsme po depozici sledovali pomocí SEM a podrobili XPS analýze. Vlákna z XPS vykazovala cca 20 at. % Cu na svém povrchu a pomocí SEM nebyla pozorována žádná poškozená nebo strukturně odlišná nanovlákná oproti vláknům před depozicí. Můžeme tedy prohlásit, že se v této práci podařilo úspěšně upravit nanovlákná antibakteriální vrstvou. I když existují publikace (např. [43]), které antibakteriální vlastnosti mědi potvrzují, bude potřeba do budoucna naše upravená vlákna podrobit buněčným experimentům na proliferaci bakteriálních buněk, abychom potvrdili, že u takto upravených vláken je tomu stejně.



## 6 ZDROJE

- [1] ZHU, Yabin, Changyou GAO a Jiacong SHEN. Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility. *Biomaterials*. 2002, **23**(24), 4889-4895. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00247-8. ISSN 01429612.
- [2] SU, Yan, Xiaoqiang LI, Yinan LIU, Qianqian SU, Marcus Lim Wei QIANG a Xiumei MO. Encapsulation and Controlled Release of Heparin from Electrospun Poly(L-Lactide-co-ε-Caprolactone) Nanofibers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2012, **22**(1-3), 165-177. DOI: 10.1163/092050609X12583785588757.
- [3] LEE, Jeonghun, Jaehan YOON, Jun-Hyun KIM, Taegwan LEE a Hongsik BYUN. Electrospun PAN-GO composite nanofibers as water purification membranes. *Journal of Applied Polymer Science*. 2018, 135(7). ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.45858
- [4] BAKER, Stephen R., Soham BANERJEE, Keith BONIN, Martin GUTHOLD, Marcus Lim Wei QIANG a Xiumei MO. Determining the mechanical properties of electrospun poly-ε-caprolactone (PCL) nanofibers using AFM and a novel fiber anchoring technique. *Materials Science and Engineering: C*. 2016, **59**(1-3), 203-212. DOI: 10.1016/j.msec.2015.09.102.
- [5] YOO, Hyuk Sang, Taek Gyoung KIM, Tae Gwan PARK, Martin GUTHOLD, Marcus Lim Wei QIANG a Xiumei MO. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009, **61**(12), 1033-1042. DOI: 10.1016/j.addr.2009.07.007.
- [6] YOO, Hyuk Sang, Taek Gyoung KIM a Tae Gwan PARK. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009, 61(12), 1033-1042. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2009.07.007
- [7] POLINI, Alessandro, Stefano PAGLIARA, Ripalta STABILE, et al. Collagen-functionalised electrospun polymer fibers for bioengineering applications. *Soft Matter*. 2010, **6**(8). DOI: 10.1039/b921932c.
- [8] SIOW, Kim Shyong, Leanne BRITCHER, Sunil KUMAR, et al. Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review. *Plasma Processes and Polymers*. 2006, **3**(6-7), 392-418. DOI: 10.1002/ppap.200600021.
- [9] QI, Pengkai, Ying YANG, Sheng ZHAO, et al. Improvement of corrosion resistance and biocompatibility of biodegradable metallic vascular stent via plasma allylamine polymerized coating. *Plasma Processes and Polymers*. 2016, **96**(6-7), 341-349. DOI: 10.1016/j.matdes.2016.02.039.
- [10] VANDENBOSSCHE, Marianne, Laetitia BERNARD, Patrick RUPPER, et al. Micro-patterned plasma polymer films for bio-sensing. *Plasma Processes and Polymers*. 2017, **114**(6-7), 123-128. DOI: 10.1016/j.matdes.2016.10.058.
- [11] CHAWLA, Attar S., Taek Gyoung KIM a Tae Gwan PARK. Use of Plasma Polymerization for Preparing Silicone-Coated Membranes for Possible Use in Blood Oxygenators. *Artificial Organs*. 1979, 3(1), 92-96. ISSN 0160564X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1525-1594.1979.tb03811.x

- [12] KUMAR, Virendra, Claude JOLIVALT, Jerome PULPYTEL, Reza JAFARI a Farzaneh AREFI-KHONSARI. Development of silver nanoparticle loaded antibacterial polymer mesh using plasma polymerization process. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2013, 101A(4), 1121-1132. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.34419
- [13] MANAKHOV, Anton, David NEČAS, Jan ČECHAL, David PAVLIŇÁK, Marek ELIÁŠ a Lenka ZAJÍČKOVÁ. Deposition of stable amine coating onto polycaprolactone nanofibers by low pressure cyclopropylamine plasma polymerization. *Thin Solid Films*. 2015, **581**, 7-13. DOI: 10.1016/j.tsf.2014.09.015.
- [14] MANAKHOV, Anton, Eva KEDROŇOVÁ, Jiřina MEDALOVÁ, Petra ČERNOCHOVÁ, Adam OBRUSNÍK, Miroslav MICHlíČEK, Dmitry V. SHTANSKY a Lenka ZAJÍČKOVÁ. Carboxyl-anhydride and amine plasma coating of PCL nanofibers to improve their bioactivity. *Thin Solid Films*. 2017, **132**, 257-265. DOI: 10.1016/j.matdes.2017.06.057.
- [15] THEOCHARIS, Achilleas D., Spyros S. SKANDALIS, Chrysostomi GIALELI a Nikos K. KARAMANOS. Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, **97**, 4-27. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
- [16] HE, Wei, ZuWei MA, Thomas YONG, Wee Eong TEO a Seeram RAMAKRISHNA. Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. *Biomaterials*. 2005, **26**(36), 7606-7615. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.049.
- [17] KELLEHER, Cassandra M. a Joseph P. VACANTI. Engineering extracellular matrix through nanotechnology. *Journal of The Royal Society Interface*. 2010, 7(suppl\_6). ISSN 1742-5689. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2010.0345.focus
- [18] DVIR, Tal, Brian P. TIMKO, Daniel S. KOHANE a Robert LANGER. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature Nanotechnology*. 2011, 6(1), 13-22. ISSN 1748-3387. Dostupné z: doi:10.1038/nnano.2010.246
- [19] PRESTWICH, Glenn D., Brian P. TIMKO, Daniel S. KOHANE a Robert LANGER. Simplifying the extracellular matrix for 3-D cell culture and tissue engineering: A pragmatic approach. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007, 101(6), 1370-1383. ISSN 07302312. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.21386
- [20] LIU, Wenying, Stavros THOMOPOULOS a Younan XIA. Electrospun Nanofibers for Regenerative Medicine. *Advanced Healthcare Materials*. 2012, 1(1), 10-25. ISSN 21922640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201100021
- [21] TECHNOLOGIE: ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ. Nanopharma [online]. Pardubice [cit. 2020-12-06]. Dostupné z: <https://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie>
- [22] KOSSEK, Sebastian a Mark FLOWERS. Electrospinning. Nanoscience Instruments [online]. Phoenix, USA [cit. 2020-12-06]. Dostupné z: <https://www.nanoscience.com/techniques/electrospin/>
- [23] LI, Yawen a Therese BOU-AKL. Electrospinning in Tissue Engineering. *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications*. InTech, 2016, 2016-12-21. ISBN 978-953-51-2821-2. Dostupné z: doi:10.5772/65836

- [24] BAJI, Avinash, Yiu-Wing MAI, Shing-Chung WONG, Mojtaba ABTAHI a Pei CHEN. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites Science and Technology*. 2010, 70(5), 703-718. ISSN 02663538. Dostupné z: doi:10.1016/j.compscitech.2010.01.010
- [25] RAYLEIGH, Lord. XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*. 2009, 14(87), 184-186. ISSN 1941-5982. Dostupné z: doi:10.1080/14786448208628425
- [26] MILOH, T., B. SPIVAK a A. L. YARIN. Needleless electrospinning: Electrically driven instability and multiple jetting from the free surface of a spherical liquid layer. *Journal of Applied Physics*. 2009, 106(11). ISSN 0021-8979. Dostupné z: doi:10.1063/1.3264884
- [27] VODSEĎÁLKOVÁ, Kateřina. Koaxiální elektrostatičké zvlákňování. Liberec, 2010. Disertační práce. TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI. Vedoucí práce David Lukáš.
- [28] CHAPMAN, Roger, ed. *Applications of Nonwovens in Technical Textiles*. Cambridge: Woodhead publishing limited, 2010. ISBN 9781439830574.
- [29] SUTKA, Anna, Silvija KUKLE, Janis GRAVITIS, Rimvydas MILAŠIUS a Jolanta MALAŠAUSKIENĚ. Nanofibre Electrospinning Poly(vinyl alcohol) and Cellulose Composite Mats Obtained by Use of a Cylindrical Electrode. *Advances in Materials Science and Engineering*. 2013, 2013, 1-6. ISSN 1687-8434. Dostupné z: doi:10.1155/2013/932636
- [30] TECHNOLOGIE NANOSPIDER [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.elmarco.cz/ns-technologie>
- [31] GORJI, M., R. BAGHERZADEH a H. FASHANDI. Electrospun nanofibers in protective clothing: A Review. *Electrospun Nanofibers*. Elsevier, 2017, 2017, 3(8), 571-598. ISBN 9780081009079. ISSN 2576-6422. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100907-9.00021-0
- [32] RAMAKRISHNA, S., R. JOSE, P. S. ARCHANA, A. S. NAIR, R. BALAMURUGAN, J. VENUGOPAL a W. E. TEO. Science and engineering of electrospun nanofibers for advances in clean energy, water filtration, and regenerative medicine: A Review. *Journal of Materials Science*. Elsevier, 2010, 2017, 45(23), 6283-6312. ISBN 9780081009079. ISSN 0022-2461. Dostupné z: doi:10.1007/s10853-010-4509-1
- [33] DUFAY, Malo, Maude JIMENEZ a Stéphanie DEGOUTIN. Effect of Cold Plasma Treatment on Electrospun Nanofibers Properties: A Review. *ACS Applied Bio Materials*. 2020, 3(8), 4696-4716. ISSN 2576-6422. Dostupné z: doi:10.1021/acsabm.0c00154
- [34] *Nanospider™* [online]. In: . [cit. 2020-12-11]. Dostupné z: <https://www.ciexpo.cz/rodokmen/oldrich-jirsak/>
- [35] FRIDMAN, Alexander. *Plasma Chemistry*. 2008. Dostupné z: doi:10.1017/CBO9780511546075
- [36] BITTENCOURT, J.A. *Fundamentals of Plasma Physics*. 3. vydání. New York: Springer-Verlag New York, 2004. ISBN 978-1-4419-1930-4
- [37] CHEN, Francis F a Jane P CHANG. *Lecture notes on principles of plasma processing*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. ISBN 978-0-306-47497-2.
- [38] LIEBERMAN, M. A. a Allan J. LICHTENBERG. *Principles of plasma discharges and materials processing*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2005. ISBN 04-717-2001-1.

- [39] CHEN, Francis F a Jane P CHANG. Lecture notes on principles of plasma processing. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. ISBN 978-0-306-47497-2.
- [40] ZLATNÍK, Rostislav. ANALÝZA PARAMETRŮ PODÁVÁNÍ PRÁŠKOVÝCH MATERIÁLŮ V TECHNOLOGII RF-ICP. Brno, 2018. Bakalářská práce. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ. Vedoucí práce Ing. Jan Čížek, Ph.D.
- [41] Magnetronové naprašování [online]. [cit. 2021-5-5]. Dostupné z: <https://matca.cz/technologie/plazmaticke-technologie/magnetronove-naprasovani/>
- [42] Magnetron Sputtering Technology Summary [online]. [cit. 2021-5-5]. Dostupné z: <https://www.brown.edu/research/labs/xiao/magnetic-sputtering-technology-summary>
- [43] KONIECZNY, Jaroslaw a Zbigniew RDZAWSKI. Antibacterial properties of copper and its alloys. Archives of Materials Science and Engineering [online]. 2012, 56(2), 53-60 [cit. 2021-5-7]. ISSN 1897-2764. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/235430943\\_Antibacterial\\_properties\\_of\\_copper\\_and\\_its\\_alloys](https://www.researchgate.net/publication/235430943_Antibacterial_properties_of_copper_and_its_alloys)
- [44] BADARAEV, A.D., A.L. NEMOYKINA, E.N. BOLBASOV a S.I. TVERDOKHLEBOV. PLLA scaffold modification using magnetron sputtering of the copper target to provide antibacterial properties. *Resource-Efficient Technologies*. 2017, 3(2), 204-211. ISSN 24056537. Dostupné z: doi:10.1016/j.refit.2017.05.004
- [45] KADAVIL, Hana, Moustafa ZAGHO, Ahmed ELZATAHRY a Talal ALTAHTAMOUNI. Sputtering of Electrospun Polymer-Based Nanofibers for Biomedical Applications: A Perspective. *Nanomaterials*. 2019, 9(1). ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano9010077
- [46] KARSLIOĞLU, R., M. UYSAL a H. AKBULUT. The effect of substrate temperature on the electrical and optic properties of nanocrystalline tin oxide coatings produced by APCVD: A critical review. *Journal of Crystal Growth*. 2011, 327(1), 22-26. DOI: 10.1016/j.jcrysgro.2011.06.003.
- [47] MERCHE, Delphine, Nicolas VANDENCASTEELE a François RENIERS. Atmospheric plasmas for thin film deposition: A critical review. *Thin Solid Films*. 2012, 520(13), 4219-4236. DOI: 10.1016/j.tsf.2012.01.026.
- [48] PROKOPOVÁ, Irena. Makromolekulární chemie. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-662-3.
- [49] FRIEDRICH, Jörg. The plasma chemistry of polymer surfaces: advanced techniques for surface design. Weinheim: Wiley-VCH, c2012. ISBN 978-3-527-31853-7.
- [50] LINDER, E. G. a A. P. DAVIS. Reactions of Hydrocarbons in the Glow Discharge. *The Journal of Physical Chemistry*. 1930, 35(12), 3649-3672. DOI: 10.1021/j150330a017.
- [51] YASUDA, Hirotugu K. a A. P. DAVIS. Some Important Aspects of Plasma Polymerization. *Plasma Processes and Polymers*. 2005, 2(4), 293-304. DOI: 10.1002/ppap.200400071.
- [52] PEIGHAMBARDOUST, S.J., S. ROWSHANZAMIR a M. AMJADI. Review of the proton exchange membranes for fuel cell applications. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010, 35(17), 9349-9384. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2010.05.017.

- [53] KIM, Jinmo, Heonyong PARK, Donggeun JUNG a Sunghoon KIM. Protein immobilization on plasma-polymerized ethylenediamine-coated glass slides. *Analytical Biochemistry*. 2003, 313(1), 41-45. DOI: 10.1016/S0003-2697(02)00563-8.
- [54] MANAKHOV, Anton, Lenka ZAJÍČKOVÁ, Marek ELIÁŠ, Jan ČECHAL, Josef POLČÁK, Jaroslav HNILICA, Štěpánka BITTNEROVÁ a David NEČAS. Optimization of Cyclopropylamine Plasma Polymerization toward Enhanced Layer Stability in Contact with Water. *Plasma Processes and Polymers*. 2014, 11(6), 532-544. DOI: 10.1002/ppap.201300177.
- [55] MANAKHOV, Anton, Ekaterina MAKHNEVA, Petr SKLÁDAL, David NEČAS, Jan ČECHAL, Lukáš KALINA, Marek ELIÁŠ a Lenka ZAJÍČKOVÁ. The robust bio-immobilization based on pulsed plasma polymerization of cyclopropylamine and glutaraldehyde coupling chemistry. *Applied Surface Science*. 2016, 360(6), 28-36. DOI: 10.1016/j.apsusc.2015.10.178.
- [56] VASILEV, Krasimir, Leanne BRITCHER, Ana CASANAL, Hans J. GRIESSER, Jan ČECHAL, Lukáš KALINA, Marek ELIÁŠ a Lenka ZAJÍČKOVÁ. Solvent-Induced Porosity in Ultrathin Amine Plasma Polymer Coatings. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008, 112(35), 10915-10921. DOI: 10.1021/jp803678w.
- [57] CONTRERAS-GARCÍA, Angel; WERTHEIMER, Michael R. Low-pressure plasma polymerization of acetylene–ammonia mixtures for biomedical applications. *Plasma chemistry and plasma Processing*, 2013, 33.1: 147-163.
- [58] DENIS, Laurent, Philippe MARSAL, Yoann OLIVIER, Thomas GODFROID, Roberto LAZZARONI, Michel HECQ, Jérôme CORNIL a Rony SNYDERS. Deposition of Functional Organic Thin Films by Pulsed Plasma Polymerization: A Joint Theoretical and Experimental Study. *Plasma Processes and Polymers*. 2009, 112(35), NA-NA. DOI: 10.1002/ppap.200900131.
- [59] MAKHNEVA, Ekaterina, Zdeněk FARKA, Petr SKLÁDAL a Lenka ZAJÍČKOVÁ. Cyclopropylamine plasma polymer surfaces for label-free SPR and QCM immunosensing of Salmonella. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018, 276, 447-455. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2018.08.055
- [60] THEOCHARIS, Achilleas D., Spyros S. SKANDALIS, Chrysostomi GIALELI a Nikos K. KARAMANOS. Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 97, 4-27. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
- [61] Collagen from calf skin [online]. [cit. 2019-02-23]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9791?lang=en&ion=CZ>
- [62] REILLY, David M. a Jennifer LOZANO. Skin collagen through the lifestages: importance for skin health and beauty. *Plastic and Aesthetic Research*. 2021, 2021. ISSN 2349-6150. Dostupné z: doi:10.20517/2347-9264.2020.153
- [63] Solouk A, Mirzadeh H, Shokrgozar MA, Solati-Hashjin M, Najarian S, Seifalian AM. The study of collagen immobilization on a novel nanocomposite to enhance cell adhesion and growth. *Iran Biomed J*. 2011;15(1-2):6-14. PMID: 21725494; PMCID: PMC3639741.
- [64] SOLOUK, Atefeh, et al. The study of collagen immobilization on a novel nanocomposite to enhance cell adhesion and growth. *Iranian biomedical journal*, 2011, 15.1-2: 6.

- [65] AFLORI, Magdalena, Mioara DROBOTA, Dan Gh. DIMITRIU, Iuliana STOICA, Bogdana SIMIONESCU a Valeria HARABAGIU. Collagen immobilization on polyethylene terephthalate surface after helium plasma treatment. *Materials Science and Engineering: B* [online]. 2013, 178(19), 1303-1310 [cit. 2021-5-8]. ISSN 09215107. Dostupné z: doi:10.1016/j.mseb.2013.04.002
- [66] PARK, Byeong-ung, Sang Min PARK, Kyoung-pil LEE, et al. Collagen immobilization on ultra-thin nanofiber membrane to promote in vitro endothelial monolayer formation. *Journal of Tissue Engineering* [online]. 2019, 10(19), 1303-1310 [cit. 2021-5-8]. ISSN 2041-7314. Dostupné z: doi:10.1177/2041731419887833
- [67] ZEUGOLIS, Dimitrios I., Shih T. KHEW, Elijah S.Y. YEW, et al. Electro-spinning of pure collagen nano-fibres – Just an expensive way to make gelatin? *Biomaterials*. 2008, 29(15), 2293-2305. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2008.02.009
- [68] BISSON, Isabelle, Jöns HILBORN, Florian WURM, Blaise MEYRAT a Peter FREY. Human urothelial cells grown on collagen adsorbed to surface-modified polymers. *Urology*. 2002, 60(1), 176-180. ISSN 00904295. Dostupné z: doi:10.1016/S0090-4295(02)01642-4
- [69] ZHU, Yabin, Mary B. CHAN-PARK, Florian WURM, Blaise MEYRAT a Peter FREY. Density quantification of collagen grafted on biodegradable polyester: Its application to esophageal smooth muscle cell. *Analytical Biochemistry*. 2007, 363(1), 119-127. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2007.01.007
- [70] BACAKOVA, Lucie, Martina TRAVNICKOVA, Elena FILOVA, Roman MATĚJKA, Jana STEPANOVSKA, Jana MUSILKOVA, Jana ZARUBOVA a Martin MOLITOR. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels: Its application to esophageal smooth muscle cell. *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field*. InTech, 2018, 2018-10-10, 363(1), 119-127. ISBN 978-1-78984-005-6. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.77115
- [71] SCHWARTZ, S M, G R CAMPBELL, J H CAMPBELL, Roman MATĚJKA, Jana STEPANOVSKA, Jana MUSILKOVA, Jana ZARUBOVA a Martin MOLITOR. Replication of smooth muscle cells in vascular disease: Its application to esophageal smooth muscle cell. *Circulation Research*. InTech, 1986, 2018-10-10, 58(4), 427-444. ISBN 978-1-78984-005-6. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/01.RES.58.4.427
- [72] CAMPBELL, Julie H., Gordon R. CAMPBELL, J H CAMPBELL, Roman MATĚJKA, Jana STEPANOVSKA, Jana MUSILKOVA, Jana ZARUBOVA a Martin MOLITOR. Smooth Muscle Phenotypic Modulation—A Personal Experience: Its application to esophageal smooth muscle cell. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. InTech, 2012, 2018-10-10, 32(8), 1784-1789. ISBN 978-1-78984-005-6. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.111.243212
- [73] Shinohara S, Shinohara S, Kihara T, Miyake J. Regulation of differentiated phenotypes of vascular smooth muscle cells, Chapter 14. In: Sugi H, editor. *Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - from Molecules to Humans*. InTech; 2012. pp. 331-344. DOI: 10.5772/3003, ISBN 978-953-51-0679-1.
- [74] MCGRATH, J. A., R. A. J. EADY a F. M. POPE. *Anatomy and Organization of Human Skin*. Rook's Textbook of Dermatology. Malden, Massachusetts, USA: Blackwell Publishing, 2004, , 45-128. ISBN 9780470750520. Dostupné z: doi:10.1002/9780470750520.ch3

- [75] NAFISI, Shohreh, Howard I. MAIBACH a F. M. POPE. Skin penetration of nanoparticles. *Emerging Nanotechnologies in Immunology*. Malden, Massachusetts, USA: Elsevier, 2018, 2018, , 47-88. ISBN 9780323400169. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-40016-9.00003-8
- [76] MANSBRIDGE, Jonathan. Tissue-engineered skin products. *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier, 2020, 2020, , 1483-1497. ISBN 9780128184226. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818422-6.00081-2
- [77] SCHOOP, Veronika M., Norbert E. FUSENIG a Nicolae MIRANCEA. Epidermal Organization and Differentiation of HaCaT Keratinocytes in Organotypic Coculture with Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*. Malden, Massachusetts, USA: Elsevier, 1999, 2018, 112(3), 343-353. ISBN 9780323400169. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x
- [78] SCHURER, Nanna, Angela KOHNE, Viola SCHLIEP, Kerstin BARLAG a Gunter GOERZ. Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Experimental Dermatology*. Malden, Massachusetts, USA: Elsevier, 1993, 2018, 2(4), 179-185. ISBN 9780323400169. ISSN 0906-6705. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0625.1993.tb00030.x
- [79] [https://www.thermofisher.com/cz/en/home/materials-science/xps-technology/multi-technique-workflow.html?cid=2020-ms-xps-multitechnique&utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=2020-ms-xps-multitechnique&gclid=Cj0KCQiA1pyCBhCtARIsAHaY\\_5c8y36o9wdzEEExZuEBNBdcrvYtaMvjA5WaMyvYVCUmJ3wAUKz7lQMlaAq98EALw\\_wcB](https://www.thermofisher.com/cz/en/home/materials-science/xps-technology/multi-technique-workflow.html?cid=2020-ms-xps-multitechnique&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=2020-ms-xps-multitechnique&gclid=Cj0KCQiA1pyCBhCtARIsAHaY_5c8y36o9wdzEEExZuEBNBdcrvYtaMvjA5WaMyvYVCUmJ3wAUKz7lQMlaAq98EALw_wcB). ThermoFisher [online]. [cit. 2021-03-09].
- [80] MACH, Radim. Teoretické studium rentgenové fotoelektronové spektroskopie 2D materiálů [online]. Olomouc, 2019 [cit. 2021-05-14]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/5j1ybx/>. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Petr Lazar, Ph.D.
- [81] <http://nano.ceitec.cz/x-ray-photoelectron-spectroscopy-kratos-analytical-axis-supra-kratos-xps/>. CEITEC NANO [online]. [cit. 2021-03-09].
- [82] ČECHAL, J. a T. ŠIKOLA. Metoda XPS v Laboratoři povrchů a tenkých vrstev ÚFI. Brno. Dostupné také z: [https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/608/mod\\_resource/content/1/XPS.pdf](https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/608/mod_resource/content/1/XPS.pdf)
- [83] RAVAL, Nidhi, Rahul MAHESHWARI, Dnyaneshwar KALYANE, Susanne R. YOUNGREN-ORTIZ, Mahavir B. CHOUGULE a Rakesh K. TEKADE. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Elsevier, 2019, 2019, , 369-400. ISBN 9780128179093. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8
- [84] Scanning Electron Microscopy [online]. [cit. 2021-03-17]. Dostupné z: <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/>
- [85] TESCAN Lyra3 [online]. [cit. 2021-03-17]. Dostupné z: <https://www.tescan.com/in-situ-testing-and-microcharacterization-of-high-entropy-alloys-using-the-tescan-lyra3-fib-sem/>
- [86] HOLLIFIED, Jeffrey M., S. BRADBURY a P.J. EVENNETT. Contrast Techniques in Light Microscopy. *Microscopy Today*. 1996, 4(8), 6-9. ISSN 1551-9295. Dostupné z: doi:10.1017/S1551929500063628

- [87] ZHANG, John X.J. a Kazunori HOSHINO. Optical transducers: Optical molecular sensing and spectroscopy. Molecular Sensors and Nanodevices. Elsevier, 2019, 2019, , 231-309. ISBN 9780128148624. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814862-4.00005-3
- [88] Fluorescence Microscopy [online]. [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: <https://microbenotes.com/fluorescence-microscope-principle-instrumentation-applications-advantages-limitations/>
- [89] Luminometer [online]. [cit. 2021-03-24]. Dostupné z: <https://www.berthold.com/en/bioanalytic/knowledge/glossary/luminometer/>
- [90] Hidex Sense Microplate Reader [online]. [cit. 2021-03-24]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/news/20131121/Microplate-readers-an-interview-with-Ville-Haaslahti-Managing-Director-Hidex.aspx>
- [91] BUNDE, Renee L., Eric J. JARVI a Jeffrey J. ROSENTERTER. Piezoelectric quartz crystal biosensors. Talanta. 1998, 46(6), 1223-1236. DOI: 10.1016/S0039-9140(97)00392-5. ISSN 00399140. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914097003925>
- [92] SCHINDELIN, Johannes, Curtis T. RUEDEN, Mark C. HINER a Kevin W. ELICEIRI. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. Molecular Reproduction and Development. 2015, 82(7-8), 518-529. ISSN 1040452X. Dostupné z: doi:10.1002/mrd.22489
- [93] Quartz Crystal Monitor (QCM). KRYSTALY, Hradec Králové, a.s. [online]. [cit. 2021-03-31]. Dostupné z: <http://www.krystal.cz/en/Products/Wafers/Monitors>



## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PCL – polykaprolakton

CPA – cyklopropylamin

ECM – extracelulární matrix

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

XPS – z angličtiny X-ray photoelectron spectroscopy; rentgenová fotoelektronová spektroskopie

EDX/EDS – z angličtiny Energy-dispersive X-ray spectroscopy; energeticky disperzní spektroskopie

PECVD – Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition, plazmochemická depozice z plynné fáze

CCP – z angličtiny capacitively coupled plasma; kapacitně vázaný doutnavý výboj

ICP – z angličtiny inductively coupled plasma; indukčně vázaný doutnavý výboj

CVD – z angličtiny Chemical vapor deposition; chemická depozice z plynné fáze

DC – z angličtiny duty cycle, střída

RF – radiofrekvenční

PBS – fosfátový pufr

PP – plazmový polymer

KOL – kolagen

VSMC – z angličtiny vascular smooth muscle cells; buňky hladkého cévního svalstva

HaCaT – lidské keratinocyty